

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
25 janvier 2001 (25.01.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/05422 A2

(51) Classification internationale des brevets: A61K 38/17

(21) Numéro de la demande internationale:

PCT/FR00/02057

(22) Date de dépôt international: 17 juillet 2000 (17.07.2000)

(25) Langue de dépôt:

français

(26) Langue de publication:

français

(30) Données relatives à la priorité:

99/09372

15 juillet 1999 (15.07.1999) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US):

BIOMERIEUX STELHYS [FR/FR]; Chemin de
L'Orme, F-69280 Marcy L'Etoile (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement): ROECK-

LIN, Dominique [FR/FR]; 14 Rue de la Paix, F-67500
Niederschaeffolsheim (FR). KOLBE, Hanno [FR/FR]; 6

Rue des Tuilliers, F-67204 Achenheim (FR). CHARLES,
Marie-Hélène [FR/FR]; 3 Allée de la Lamperte, F-69420
Condrieu (FR). MALCUS, Carine [FR/FR]; 9 Rue des
Ronzières, F-69530 Brignais (FR). SANTORO, Lyse
[FR/FR]; 47 Avenue Bergeron, F-69260 Charbonnières les
Bains (FR). PERRON, Hervé [FR/FR]; 15 Rue de Boyer,
F-69005 Lyon (FR).

(74) Mandataire: DIDIER, Mireille; Cabinet Germain et
Maureau, Boîte Postale 6153, F-69466 Lyon Cedex 06
(FR).

(81) États désignés (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (régional): brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: USE OF A POLYPEPTIDE FOR DETECTING, PREVENTING OR TREATING A PATHOLOGICAL CONDITION
ASSOCIATED WITH A DEGENERATIVE, NEUROLOGICAL OR AUTOIMMUNE DISEASE

(54) Titre: UTILISATION D'UN POLYPEPTIQUE POUR DETECTER, PREVENIR OU TRAITER UN ETAT PATHOLOGIQUE
ASSOCIE A UNE MALADIE DEGENERATIVE, NEUROLOGIQUE AUTOIMMUNE

(57) Abstract: The invention concerns the use of at least one polypeptide comprising a protein fragment to obtain a diagnostic, prognostic, prophylactic or therapeutic composition for detecting, preventing or treating a pathological condition associated with a degenerative and/or neurological and/or autoimmune disease, said protein being selected among the proteins whereof the peptide sequence in native state corresponds to SEQ ID No 1, SEQ ID No 2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4, SEQ ID No 5, SEQ ID No 6, SEQ ID No 7, SEQ ID No 8, SEQ ID No 9, SEQ ID No 10, SEQ ID No 11, SEQ ID No 12, SEQ ID No 13, SEQ ID No 14, SEQ ID No 15, SEQ ID No 16, SEQ ID No 17, SEQ ID No 18, SEQ ID No 19, SEQ ID No 20, SEQ ID No 21, SEQ ID No 22, SEQ ID No 23, SEQ ID No 24, SEQ ID No 25, SEQ ID No 26, SEQ ID No 27, SEQ ID No 28 and SEQ ID No 29, and the peptide sequences having at least 70 % identity, preferably at least 80 % identity and advantageously at least 98 % identity with any one of the peptide sequences SEQ ID No 1 to SEQ ID No 8 and SEQ ID No 10 to SEQ ID No 29, and the peptide sequences or fragments of said sequences belonging to a common family of proteins selected among perlecan, the precursor of the retinol-binding plasmatc protein, of the precursor of the activator of GM2 ganglioside, of calgranulin B and of saponin B.

(57) Abrégé: Utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 à SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

WO 01/05422 A2



MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

Publiée:

— *Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.*

UTILISATION D'UN POLYPEPTIDE POUR DETECTER, PREVENIR OU
TRAITER UN ETAT PATHOLOGIQUE ASSOCIE A UNE MALADIE
DEGENERATIVE, NEUROLOGIQUE AUTOIMMUNE

5 La présente invention concerne notamment l'utilisation d'au moins un polypeptide, pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune et/ou neurologique.

Selon l'invention, on entend par maladie dégénérative, une maladie dans
10 laquelle un processus de mort cellulaire ou de destruction cellulaire est associé à des troubles physiologiques et/ou cliniques. La maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique, la maladie de Parkinson sont classées parmi les maladies neurodégénératives. On entend par maladie auto-immune, une hyperréactivité du système immunitaire vis à vis d'un ou de plusieurs auto-antigène(s). La sclérose en
15 plaques (SEP), la polyarthrite rhumatoïde (PR) et le lupus érythémateux sont classés dans les maladies auto-immunes.

La sclérose en plaques est une maladie chronique du système nerveux central de l'homme, évoluant par succession de phases de rémission et de poussée ou selon une progression régulière, dont la caractéristique anatomopathologique consiste
20 en la formation de zones de démyélinisation bien délimitées dans la substance blanche du cerveau et de la moelle épinière.

Au niveau histologique, ces zones présentent au stade précoce du processus lésionnel, une dégradation de la myéline péri-axonale associée à une atteinte des cellules gliales responsable de cette démyélinisation. Une activation
25 macrophagique inflammatoire impliquant les cellules microgliales (macrophages tissulaires résidants du système nerveux central), ainsi que, probablement, des macrophages provenant de monocytes sanguins infiltrés, est associée à ce processus de démyélinisation et contribue à la destruction des feuillets myélinisés. Au centre de la zone démyélinisée, une déplétion relative en cellules gliales est retrouvée alors qu'une
30 prolifération d'astrocytes se développe à la périphérie et peut envahir la plaque démyélinisée pour générer une plaque fibreuse ou gliotique. Ces structures sclérotiques sont à l'origine du nom donné à la maladie.

Une autre caractéristique de ces plaques est leur association quasi systématique avec un élément vasculaire autour duquel elles se développent.

Au niveau histologique, on observe une altération fréquente de la barrière hémato-encéphalique (BHE) constituée par l'endothélium capillaire. Un des éléments
5 déterminants dans le maintien de la BHE est constitué par la présence sous-jacente d'extensions cytoplasmiques des astrocytes, appelées pieds astrocytaires. Vraisemblablement, les pieds astrocytaires induisent la formation ou permettent le maintien de structures de jonction étanches qui assurent la cohésion de la barrière endothéliale capillaire concrétisant la BHE. Or, différents modèles pathologiques font
10 état de l'altération de la BHE et d'une déplétion des pieds astrocytaires.

Par ailleurs, dans le processus lésionnel de la SEP, l'altération de la BHE contribue à amplifier la réponse inflammatoire associée, par l'afflux de cellules lymphoïdes provenant de la circulation sanguine. La contribution de l'inflammation associée aux cellules immunitaires est importante dans la SEP et participe au processus
15 lésionnel.

L'étiologie de la SEP est source d'un débat d'actualité car la maladie pourrait avoir des origines diverses. Des hypothèses ont été émises sur une origine bactérienne et/ou virale. Par ailleurs, comme décrit dans la demande de brevet WO 95/21859, H. Perron et al. ont été conduits à rechercher un ou des agents effecteurs
20 du processus pathogénique aboutissant à la formation typique de plaques de démyélinisation et à une gliose astrocytaire. Dans le cadre de cette étude, ils ont mis en évidence la présence dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) et le sérum de patients SEP d'au moins un facteur qui présente une activité toxique vis à vis des cellules astrocytaires et oligodendrocytaires humaines ou animales. Cette activité toxique se
25 caractérise par une désorganisation cytomorphologique du réseau de filaments intermédiaires et/ou une dégradation des protéines desdits filaments et/ou une mort cellulaires par apoptose des cellules gliales. Ils ont établi une corrélation significative entre la détection *in vitro* de cette activité toxique dans des échantillons de LCR et de sérum de patients SEP et la sclérose en plaques par un dosage colorimétrique
30 quantitatif au bromure de méthyltétrazolium (MTT) des cellules vivantes, comme décrit dans la demande de brevet WO 95/21859. Par ailleurs, C. Malcus-Vocanson *et al.* ont montré que l'urine est un fluide biologique très favorable pour la détection de

l'activité de ce facteur toxique et développe un procédé utilisant la cytométrie de flux pour détecter et ou quantifier les cellules gliales adhérentes mortes par apoptose. Toutes les informations concernant ce procédé sont décrites dans la demande de brevet WO 98-11439, dont le contenu est incorporé à titre de référence.

5 Des essais ont été réalisés à partir d'une fraction protéique de LCR et d'une urine de patients SEP pour tenter d'identifier ce facteur toxique. Le contenu protéique de chaque fraction a été séparé sur gel SDS-PAGE 12 % et observé après coloration du gel à l'argent. Parmi les protéines observées, une fraction protéique centrée sur un poids moléculaire apparent d'environ 21 kD a été trouvée
10 minoritairement associée à l'activité toxique détectée *in vitro* et une fraction centrée sur un poids moléculaire apparent d'environ 17 kD a été trouvée majoritairement associée à cette activité toxique.

Une injection de la fraction provenant de LCR de patients SEP dans le cerveau de rat Lewis et une observation histologique post-mortem de coupes de
15 cerveau des rats a permis d'observer, trois mois après l'injection, une apoptose de la population astrocytaire et la formation de plaques de démyélinisation. Toutes les informations sont contenues dans la demande de brevet WO 97/33466, dont le contenu est incorporé à titre de référence. Ces observations sont conformes à celles qui ont pu être faites sur des coupes de cerveau de patients atteints de SEP, après biopsie (N.
20 Benjelloun et al. Cell. Mol. Biol., 1998, 44 (4), 579-583).

Les présents inventeurs ont maintenant identifié et analysé les protéines associées à cette activité toxique vis à vis des cellules gliales dans des échantillons biologiques de patients SEP, en particulier dans l'urine, le liquide céphalo-rachidien et le sérum.

25 Après purification des protéines et séparation sur gel SDS-TRICINE, les inventeurs ont mis en évidence la présence de quatre bandes d'intérêt de différents poids moléculaires apparents, respectivement de 8, 14, 18 et 20 kD correspondant à au moins cinq familles de protéines différentes. Les protéines de ces familles ont ensuite été analysées par spectrométrie de masse et/ou séquençage et recherche d'homologie
30 dans les banques de données (NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, Basic Blast Search, Protein Blastp, les séquences protéiques sont entrées en format FASTA dans la base de données nr, l'algorithme utilisé est Matrix BLOSUM62, l'identité dénommée

“ Identities ” correspond au nombre d’acides aminés identiques donné en pourcentage et la positivité “ Positives ” correspond aux acides aminés présentant une équivalence biologique selon les paramètres susmentionnés du logiciel donnés en pourcentage). Ces protéines appartiennent aux familles des protéines du Perlecan, du précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l’activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline et de la saposine B. Plus précisément, les protéines sont (i) pour la bande de 20 kD le fragment C-terminal du Perlecan qui commence à l’acide aminé 3464 et se termine à l’acide aminé 3707 (Murdoch AD et al. J Biol Chem, 1992, April 25 ;267 (12) :8544-47), et référencé dans l’identificateur de séquences SEQ ID N° 2 (la protéine entière Perlecan étant référencée en SEQ ID N°1), (ii) pour la bande de 20 kD le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol (Monaco HL et al., Science, 1995, 268 (5213) :1039-1041) dont la séquence est donnée en SEQ ID N° 4, (iii) pour la bande de 18 kD le précurseur de l’activateur du ganglioside GM2 (Furst W et al., Euro J Biochem, 1990, Sep 24 ; 193(3) :709-14) identifié en SEQ ID N° 8, (iv) pour la bande de 14 kD la calgranuline B (Lagasse E et al., Mol Cell Biol, 1988, Jun ;8(6) :2402-10) identifiée en SEQ ID N° 17 et (v) pour la bande de 8 kD la saposine B (Kleinschmidt T et al., Biol Chem Hoppe Seyler, 1988, Dec ;369(12) :1361-5) représentée en SEQ ID N° 24. Ils ont par ailleurs mis également en évidence la présence de séquences variantes auxdites séquences de référence, en particulier pour la bande de 18 kD une séquence variante du précurseur de l’activateur du ganglioside GM2 référencée SEQ ID N° 9. Ces séquences protéiques variantes sont le produit de mutations au niveau des gènes codant pour lesdites protéines ou sont le résultats de phénomènes d’épissage. Il est à noter par exemple que la calprotectine est un variant de la calgranuline B.

Le fragment C-terminal de la protéine Perlecan (SEQ ID N° 2) est codée par exemple par la séquence nucléotidique ADN SEQ ID N° 69, en tenant compte du code génétique. La protéine précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol (SEQ ID N° 4) est codée par exemple par la séquence nucléotidique ADN SEQ ID N° 70, en tenant compte du code génétique. La protéine activatrice du GM2 (SEQ ID N° 8) est codée par exemple par la séquence nucléotidique ADN SEQ ID N° 31, en tenant compte du code génétique. Les peptides FSWDNCFEGK DPAVIR et YSLPKSEFAV PDLELP issus du polypeptide muté activateur du GM2 (SEQ ID N°9) sont codés par les

sequences nucléotidiques ADN SEQ ID N° 66 et SEQ ID N° 67 respectivement, en tenant compte du code génétique. La protéine calgranuline B (SEQ ID N° 17) est codée par exemple par la séquence nucléotidique ADN SEQ ID N° 42, en tenant compte du code génétique. La protéine saposine B (SEQ ID N° 24) est codée par exemple par la
5 séquence nucléotidique ADN SEQ ID N° 53, en tenant compte du code génétique.

Par famille de protéines on entend l'ensemble des protéines codées à partir d'un même gène d'ADN et qui résultent d'un multi-épissage différentiel du gène et/ou d'un cadre de lecture différent. Le gène ADN est transcrit avec des phénomènes d'épissage alternatif ce qui conduit à la traduction de différentes séquences primaires
10 de protéines. Toutes ces protéines appartiennent à une même famille protéique. On inclut également dans le terme " famille protéique ", les protéines qui présentent au moins 70% d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec une séquence protéique de référence de la famille.

On entend par multi-épissage, un épissage intervenant au moins une fois
15 dans la région nucléotidique d'intérêt.

Par exemple, par famille de protéine précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, on désigne la famille de protéines comprenant *au moins* les protéines ou fragment de protéines de séquence SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, et les protéines codées par le gène correspondant selon différents
20 cadres de lecture.

Par exemple, par famille de protéine activatrice du GM2, on désigne la famille de protéines comprenant *au moins* les protéines ou fragments de protéines de séquence SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, et les protéines codées
25 par le gène correspondant selon différents cadres de lecture, qui résultent d'un multi-épissage différentiel du gène et/ou d'un cadre de lecture différent.

Par exemple, par famille de protéine calgranuline B, on désigne la famille de protéines comprenant *au moins* les protéines ou fragments de protéines de séquence SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID
30 N° 22, SEQ ID N° 23, et les protéines codées par le gène correspondant selon différents cadres de lecture, qui résultent d'un multi-épissage différentiel du gène et/ou d'un cadre de lecture différent. Les protéines MRP14 (SEQ ID N° 17) et MRP8 (SEQ ID N°

18) ont une séquence protéique différente tout en étant codées par un même gène ; elles appartiennent à la même famille protéique.

Par exemple, par famille de protéine saposine B, on désigne la famille de protéines comprenant *au moins* les protéines ou fragments de protéines de séquence
5 SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28, SEQ ID N° 29, et les protéines codées par le gène correspondant selon différents cadres de lecture, qui résultent d'un multi-épissage différentiel du gène et/ou d'un cadre de lecture différent.

Par famille d'acides nucléiques codant pour une protéine on entend
10 l'ensemble des séquences nucléiques ADNc et/ou ARN transcrits à partir d'un même gène ADN et, qui résultent d'un multi-épissage différentiel. Le gène ADN est transcrit avec des phénomènes d'épissage différentiels et conduit à la synthèse de différents acides nucléiques (ADNc, ARN) de séquences différentes. Toutes ces séquences ADNc et ARNm sont considérées comme appartenant à une même famille d'acides
15 nucléiques.

Par exemple, par famille d'acides nucléiques codant pour la famille de protéine précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, on désigne la famille d'acides nucléiques comprenant *au moins* les acides nucléiques ou fragments de séquence SEQ ID N°30.

20 Par exemple, par famille d'acides nucléiques codant pour la famille de protéine activatrice du GM2, on désigne la famille d'acides nucléiques comprenant *au moins* les acides nucléiques ou fragments de séquences SEQ ID N° 31, SEQ ID N° 32, SEQ ID N° 33, SEQ ID N° 34, SEQ ID N° 35, SEQ ID N° 36, SEQ ID N° 37, SEQ ID N° 38, SEQ ID N° 39, SEQ ID N° 40, SEQ ID N° 41 qui résultent d'un multi-épissage
25 différentiel du gène et/ou d'un cadre de lecture différent.

Par exemple, par famille d'acides nucléiques codant pour la famille de protéine calgranuline B, on désigne la famille d'acides nucléiques comprenant *au moins* les acides nucléiques ou fragments de séquences SEQ ID N° 42, SEQ ID N° 43, SEQ ID N° 44, SEQ ID N° 45, SEQ ID N° 46, SEQ ID N° 47, SEQ ID N° 48, SEQ ID
30 N° 49, SEQ ID N° 50, SEQ ID N° 51, SEQ ID N° 52 qui résultent d'un multi-épissage différentiel du gène et/ou d'un cadre de lecture différent.

Par exemple, par famille d'acides nucléiques codant pour la famille de protéine saposine B, on désigne la famille d'acides nucléiques comprenant *au moins* les acides nucléiques ou fragment de séquences SEQ ID N° 53, SEQ ID N° 54, SEQ ID N° 55 qui résultent d'un multi-épissage différentiel du gène et/ou d'un cadre de lecture différent.

Par « épissage » on entend un mécanisme d'excision des introns et de raboutage des exons au cours de la maturation des transcrits et par "épissage différentiel" on entend l'existence de plusieurs schémas d'épissage d'un transcrit primaire aboutissant à la formation de différents ARN messagers et, pouvant donner lieu à la synthèse de plusieurs protéines différentes (Kaplan et Delpech, Biologie Moléculaire et Médecine, 1993, 2^{ème} édition, Médecine et Sciences, Flammarion, pages 73-77). CE phénomène est largement décrit dans la littérature scientifique. A titre d'exemple, on peut citer le modèle des gènes qui codent pour les chaînes lourdes et légères des immunoglobulines, le modèle du gène de la dystrophine, le modèle du gène de l'alpha amylase, le gène de la myéline, etc...

Il est connu que les gènes eucaryotes, notamment, comprennent des régions (exons) qui codent pour des fragments de la protéine codée par ledit gène et d'autres régions (introns) qui n'ont pas d'équivalent protéique. Ceci est dû au fait que les gènes sont d'abord transcrits en un ARN "primaire" qui est ensuite coupé par des enzymes d'épissage au niveau de sites nucléotidiques spécifiques (sites d'épissage). Ces enzymes raboutent ensuite les régions codant pour la protéine, reconstituant ainsi un ARN "secondaire" dont les régions introniques ont été éliminées. Par ailleurs, selon les phénotypes cellulaires (et donc les tissus ou la différenciation) ces enzymes ne sont pas toutes exprimées et, ainsi, un même ARN peut être épissé différemment dans les cellules d'un même individu, générant ainsi des protéines avec des différences de séquence. Cependant, ces phénomènes peuvent aussi s'appliquer à des régions nucléotidiques qui sont entièrement codantes (exons), mais qui, selon différents épissages possibles vont générer plusieurs protéines différentes à partir de la même région nucléotidique, par phénomène d'épissage différentiel entre les différents produits protéiques.

De plus, il est connu que des régions nucléotidiques peuvent avoir plusieurs cadres de lecture selon les trois trames potentielles du code génétique. Ainsi,

la présence de plusieurs codons initiateurs de traduction dans plusieurs phases de lecture et/ou un épissage d'ARN primaire raboutant des séquences nucléotiques présentes dans des phases de lectures différentes sur l'ADN, permet à une même région ADN de générer des produits protéiques sans rapports entre eux, du point de vue de la
5 séquence peptidique.

Enfin, le polymorphisme génétique existant entre les individus d'une même espèce et/ou des mutations individuelles peuvent créer ou supprimer des sites d'épissage dans une région ADN donnée et, ainsi, modifier la séquence et la structure du ou des produits protéiques normalement produits par cette région.

10 Ainsi, la combinaison de ces différents phénomènes peut permettre qu'une même séquence nucléotidique correspondant à un segment d'ADN, identifiée comme déterminant une région génétique d'intérêt dans une étude donnée, comprenne l'information nécessaire et suffisante pour définir toute une famille d'ARN épissés selon des schémas différentiels et alternatifs, dans des cadres de lecture divers et, par là
15 évidemment, de protéines et de polypeptides ayant des séquences " mosaïques " selon un cadre de lecture voire selon les trois cadres potentiels et des mutations éventuellement liées au polymorphisme génétique.

Un exemple de ce phénomène peut être représenté par la région nucléotidique du gène *env* du rétrovirus HIV-1. En effet, plusieurs protéines différentes
20 sont codées par des segments de la même séquence : par exemple, la glycoprotéine d'enveloppe, et les protéines régulatrices TAT, REV, NEF, VIF.

Il est encore connu que des protéines peuvent résulter de l'assemblage de sous-unités identiques (homodimères, homomultimères) ou différentes (hétérodimères, hétéromultimères). Ainsi, les différents produits protéiques codés par une même région
25 ADN peuvent aussi s'assembler entre eux pour constituer des entités protéiques complexes multimériques. Ce phénomène s'ajoute aux précédents et, lorsqu'une protéine est identifiée par un fragment peptidique, on peut logiquement identifier tous les autres éléments constitutifs de cette protéine complexe et les segments ADN et ARN épissé qui les codent, ainsi que tous les membres de la famille de produits protéiques et leurs assemblages.

30 Un autre exemple est fourni par la région d'ADN humain codant pour la famille de protéines MRP14 ou calgranuline B, MRP8, calprotectine, psoriasine etc...

Aussi, la présente invention a pour objet l'utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour obtenir une

composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques précitées, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B. Dans des modes de réalisation particuliers au moins deux polypeptides précités sont utilisés en combinaison pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune.

L'invention concerne également l'utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 17 et SEQ ID N° 24 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques précitées. Avantageusement les cinq polypeptides qui répondent à la définition précédente sont utilisés en combinaison.

De préférence, la séquence peptidique dudit polypeptide comprend, ou consiste en une séquence choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 17 et SEQ ID N° 24.

L'invention concerne encore l'utilisation d'au moins un fragment d'un des
5 polypeptiques précités pour la préparation d'un peptide immunogène, ledit peptide comprenant tout ou partie d'au moins une des séquences référencées SEQ ID N°s 58 à 65 et étant utilisé pour la production d'anticorps monoclonaux.

L'invention a également pour objet, l'utilisation d'au moins un fragment
nucléotidique, pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique
10 ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, selon laquelle ledit fragment nucléotidique est choisi parmi des fragments qui codent pour au moins un fragment d'une protéine, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N°
15 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 ET SEQ ID N° 29 et les séquences peptidiques qui présentent
20 au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques ci dessus, et les fragments complémentaires desdits fragments, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine
25 B. Il est à la portée de l'homme du métier de déterminer les séquences nucléiques des fragments nucléotidiques à partir des séquences peptidiques et du code génétique, ceci faisant partie de ses connaissances générales.

De préférence, ledit fragment nucléotidique code pour une protéine qui à
30 l'état natif consiste en une séquence choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N°s 1 à 8 et SEQ ID N°s 10 à 29 précitées, et parmi les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies

parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

Un autre objet de l'invention est l'utilisation d'au moins un fragment nucléotidique pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune selon laquelle ledit fragment est un fragment d'une séquence nucléique choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 30, SEQ ID N° 31, SEQ ID N° 32, SEQ ID N° 33, SEQ ID N° 34, SEQ ID N° 35, SEQ ID N° 36, SEQ ID N° 37, SEQ ID N° 38, SEQ ID N° 39, SEQ ID N° 40, SEQ ID N° 41, SEQ ID N° 42, SEQ ID N° 43, SEQ ID N° 44, SEQ ID N° 45, SEQ ID N° 46 et SEQ ID N° 47, SEQ ID N° 48, SEQ ID N° 49 et SEQ ID N° 50, SEQ ID N° 51, SEQ ID N° 52, SEQ ID N° 53, SEQ ID N° 54, SEQ ID N° 55, SEQ ID N° 56, SEQ ID N° 57, SEQ ID N° 67, SEQ ID N° 66, SEQ ID N° 69, SEQ ID N° 70 et SEQ ID N° 71 et leurs séquences complémentaires.

L'invention concerne également l'utilisation d'un ligand spécifique d'un polypeptide ou d'un fragment nucléotidique tel que défini ci dessus pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune.

Par ligand, on entend toute molécule susceptible de s'associer au polypeptide, tel que un anticorps monoclonal, un anticorps polyclonal, un récepteur, un substrat d'activité enzymatique, une enzyme dont ledit polypeptide est un cofacteur. La production d'anticorps polyclonaux et monoclonaux fait partie des connaissances générales de l'homme du métier. On peut citer à titre de référence Köhler G. et Milstein C. (1975) : Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature* 256 :495-497 et Galfre G. et al. (1977) *Nature*, 266 : 522-550 pour la production d'anticorps monoclonaux et Roda A., Bolelli G.F. : Production of high-titer antibody to bile acids, *Journal of Steroid Biochemistry*, Vol. 13, pp. 449-454 (1980) pour la production d'anticorps polyclonaux.

Par ligand, on entend également toute molécule susceptible de s'associer à un fragment nucléotidique, tel qu'un fragment nucléotidique partiellement ou

totalelement complémentaire, un polynucléotide complémentaire, un anticorps anti-acides nucléiques. La production de fragments nucléotidiques ou de polynucléotides fait partie des connaissances générales de l'homme du métier. On peut notamment citer l'utilisation d'enzymes de restriction, et la synthèse chimique sur synthétiseur
5 automatique, par exemple sur des synthétiseurs commercialisés par la société Applied Biosystem. Par ailleurs, on connaît des techniques pour la production d'anticorps anti-acides nucléiques. On peut citer à titre d'exemples Philippe Cros et al., *Nucleic Acids Researc*, 1994, Vol. 22, N°. 15, 2951-2957 ; Anderson, W.F. et al. (1988) *Bioessays*, 8 (2), 69-74 ; Lee, J.S. et al. (1984) *FEBS Lett.*, 168, 303-306 ; Malfoy, B. et al. (1982)
10 *Biochemistry*, 21(22), 5463-5467 ; Stollar, B.D. et al., J.J. (eds) *Methods in Enzymology*, Academic Press, pp. 70-85 ; Traincard, F. et al. (1989) *J. Immunol. Meth.*, 123, 83-91 et Traincard, F. et al. (1989) *Mol. Cell. Probes*, 3, 27-38).

L'invention a encore pour objet un procédé pour détecter au moins une protéine associée à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, dans un échantillon
15 biologique dans lequel on met en contact l'échantillon biologique avec au moins un ligand spécifique d'au moins un polypeptide, ledit polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine et ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N°
20 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement
25 au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 à 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B, puis on
30 détecte la formation d'un complexe entre ledit polypeptide et ledit ligand. Ledit ligand est avantageusement un anticorps monoclonal, un anticorps polyclonal, un récepteur,

un substrat d'activité enzymatique ou une enzyme dont ledit polypeptide est un cofacteur.

De même, l'invention concerne un procédé pour détecter au moins un ligand associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce que l'on met en contact l'échantillon biologique avec au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N°s 10 à SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B, puis on détecte la formation d'un complexe entre ledit polypeptide et ledit ligand. Le ligand est toute molécule qui répond aux conditions précédemment décrites.

De préférence, dans les procédés décrits ci dessus la séquence du polypeptide comprend ou consiste en une séquence peptidique choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 1 à 8 et SEQ ID N° 10 à 29 précédentes et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

L'invention concerne également un nouveau polypeptide qui comprend au moins un fragment d'une protéine dont la séquence peptidique correspond à SEQ ID N° 9, ledit fragment présentant au moins une mutation, en particulier au moins deux mutations par rapport à la séquence de référence SEQ ID N° 8. Le polypeptide est

avantageusement choisi parmi les polypeptides qui comprennent la séquence en acides aminés FSWDNCFEGKDPVIR, référencée SEQ ID N° 68 et la séquence en acides aminés YSLPKSEFAVPDLELP, référencée SEQ ID N° 72.

En particulier, ledit polypeptide comprend ou consiste en SEQ ID N° 9.
5 Ce polypeptide est utilisé pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, seul ou en mélange avec au moins un polypeptide tel que défini précédemment.

L'un des objet de l'invention est également un fragment nucléotidique qui
10 code pour le fragment de la protéine dont la séquence peptidique correspond à SEQ ID N° 9, ledit fragment de ladite protéine présentant au moins une mutation, en particulier deux mutations par rapport à la séquence de référence SEQ ID N° 8. Ledit fragment nucléotidique, en particulier, comprend ou consiste en un fragment qui code pour SEQ ID N° 9. Ce fragment est utilisé pour obtenir une composition diagnostique,
15 pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, seul ou en mélange avec au moins un fragment nucléotidique tel que défini précédemment.

L'invention a aussi pour objet un procédé pour détecter au moins un ligand associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, dans un échantillon
20 biologique, selon lequel on met en contact l'échantillon biologique avec au moins le polypeptide qui comprend ou consiste en SEQ ID N° 9 ou un mélange de polypeptides comprenant ce polypeptide et au moins un polypeptide tel que décrit ci dessus, puis on détecte la formation d'un complexe ou de complexes entre le ou les polypeptides et le ou les ligands correspondants ; étant entendu que par ligand on entend une molécule
25 qui répond aux conditions précitées.

L'invention concerne également un procédé pour détecter au moins le polypeptide référence SEQ ID N° 9 ou un fragment dudit polypeptide, ce fragment comprenant au moins une et de préférence deux mutations par rapport à la séquence de référence SEQ ID N° 8, dans un échantillon biologique selon lequel on met en contact
30 l'échantillon biologique avec au moins un ligand spécifique dudit polypeptide, puis on détecte la formation d'un complexe entre ledit polypeptide et ledit ligand. La définition de ligand correspond à celle définie précédemment. Il peut s'agir entre autres d'un

anticorps monoclonaux, d'un anticorps polyclonal, d'un substrat d'activité enzymatique, ou d'une enzyme dont ledit polypeptide est un cofacteur, d'un récepteur.

On peut également mettre en contact l'échantillon biologique avec un ligand spécifique du polypeptide référence SEQ ID N°9 et au moins un ligand spécifique d'au moins un autre polypeptide tel que défini précédemment, puis on détecte la formation de complexes entre lesdits polypeptides et lesdits ligands spécifiques desdits polypeptides ; étant entendu que par ligand on entend une molécule qui répond aux conditions décrites précédemment.

Un autre objet de l'invention est un fragment nucléotidique codant pour tout ou partie du polypeptide SEQ ID N° 9, et son utilisation pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, éventuellement en association avec au moins un fragment nucléotidique tel que défini précédemment, et les fragments complémentaires desdits fragments.

Par fragment polypeptidique, on entend au moins tout ou partie de la séquence peptidique d'une protéine, en particulier un fragment polypeptique qui comprend environ entre 5 et 15 acides aminés et plus précisément environ entre 5 et 10 acides aminés et 6 et 15 acides aminés. Et par fragment nucléotidique, on entend au moins tout ou partie d'une séquence nucléotidique, étant entendu que par séquence nucléotidique, sont couvertes les séquences ADN et ARN.

En particulier, par fragment polypeptidique ou nucléotidique, on entend soit des fragments associés à une même unité moléculaire, soit des fragments dans un complexe moléculaire comprenant plusieurs sous-unités homologues ou hétérologues obtenues de manière naturelle ou artificielle, notamment par multi-épissage différentiel ou par synthèse sélective.

L'invention concerne aussi un procédé pour détecter au moins un polypeptide tel que défini précédemment, selon lequel on prélève un échantillon d'un fluide biologique d'un patient présentant un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune et éventuellement après purification dudit échantillon de fluide biologique, on analyse par spectrométrie de

masse le profil de masse obtenu à partir du fluide biologique et on compare à un profil de masse de référence.

La présente invention concerne également l'utilisation *d'au moins* un polypeptide de l'invention pour définir des agents efficaces thérapeutiquement, et
5 l'utilisation de ces agents pour prévenir et/ou traiter une maladie auto-immune et/ou neurologique et/ou dégénérative, en particulier la sclérose en plaques.

Ainsi, d'autres objets de l'invention sont les suivants :

- Utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour tester l'efficacité d'un agent thérapeutique, ladite protéine étant
10 choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23,
15 SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de
20 protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B ;

- Utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour définir un matériel biologique pour la préparation d'une
25 composition pharmaceutique destinée au traitement d'une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, telle que la sclérose en plaques, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ
30

ID N° 29, les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline et de la saposine ;

Selon une variante avantageuse de l'une des utilisations précédentes, le polypeptide est choisi parmi SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 ;

10 - Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique, pour tester l'efficacité d'un agent thérapeutique pour un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, selon laquelle ledit fragment nucléotidique est choisi parmi les fragments qui codent pour au moins un fragment d'une protéine, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif
15 correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ
20 ID N° 28 et SEQ ID N° 29, les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les fragments complémentaires desdits fragments et les fragments qui codent pour les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de
25 protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

- Utilisation pour tester l'efficacité d'un agent thérapeutique pour un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, de protéines recombinantes et/ou codées par tout ou partie des fragments
30 nucléotidiques définis au paragraphe précédent ;

- Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, telle que la sclérose en plaques, selon laquelle ledit fragment nucléotidique est choisi parmi des fragments
5 qui codent pour au moins un fragment d'une protéine, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID
10 N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les fragments complémentaires desdits
15 fragments et les fragments qui codent pour les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B ;

- Utilisation pour la préparation d'une composition pharmaceutique
20 destinée au traitement d'une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, telle que la sclérose en plaques, de protéines recombinantes et/ou codées par tout ou partie des fragments nucléotidiques définis au paragraphe précédent.

Avantageusement, ledit fragment nucléotidique utilisé code pour ladite protéine.

25 De préférence, la séquence peptidique de ladite protéine à l'état natif consiste en une séquence choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 1 à 29, les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les séquences peptidiques ou les
30 fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du

precursur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B. Les polypeptides sont préférentiellement choisis parmi SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24.

- Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique, pour tester l'efficacité d'un agent thérapeutique pour un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune selon laquelle ledit fragment est un fragment d'une séquence nucléique choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 30, SEQ ID N° 31, SEQ ID N° 32, SEQ ID N° 33, SEQ ID N° 34, SEQ ID N° 35, SEQ ID N° 36, SEQ ID N° 37, SEQ ID N° 38, SEQ ID N° 39, SEQ ID N° 40, SEQ ID N° 41, SEQ ID N° 42, SEQ ID N° 43, SEQ ID N° 44, SEQ ID N° 45, SEQ ID N° 46 et SEQ ID N° 47, SEQ ID N° 48, SEQ ID N° 49 et SEQ ID N° 50, SEQ ID N° 51, SEQ ID N° 52, SEQ ID N° 53, SEQ ID N° 54, SEQ ID N° 55, SEQ ID N° 56, SEQ ID N° 57, SEQ ID N° 66, SEQ ID N° 67, SEQ ID N° 69, SEQ ID N° 70, SEQ ID N° 71, et leurs séquences complémentaires.

- Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, telle que la sclérose en plaques selon laquelle ledit fragment est un fragment d'une séquence nucléique choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 30, SEQ ID N° 31, SEQ ID N° 32, SEQ ID N° 33, SEQ ID N° 34, SEQ ID N° 35, SEQ ID N° 36, SEQ ID N° 37, SEQ ID N° 38, SEQ ID N° 39, SEQ ID N° 40, SEQ ID N° 41, SEQ ID N° 42, SEQ ID N° 43, SEQ ID N° 44, SEQ ID N° 45, SEQ ID N° 46 et SEQ ID N° 47, SEQ ID N° 48, SEQ ID N° 49 et SEQ ID N° 50, SEQ ID N° 51, SEQ ID N° 52, SEQ ID N° 53, SEQ ID N° 54, SEQ ID N° 55, SEQ ID N° 56, SEQ ID N° 57, SEQ ID N° 66, SEQ ID N° 67, SEQ ID N° 68, SEQ ID N° 69, SEQ ID N° 70, SEQ ID N° 71, et leurs séquences complémentaires.

La séquence nucléique est de préférence choisie parmi SEQ ID N° 30, 31, 42, 53.

- Utilisation de la lycorine pour la préparation d'une composition pour la prévention et/ou le traitement de maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune.

Par efficacité thérapeutique, on entend le bénéfice clinique et biologique acquis après administration d'un agent thérapeutique en vue d'une amélioration, voire

d'une guérison de la maladie. Ce bénéfice se traduit entre autre par une diminution des signes cliniques, biologiques, et des effets pathologiques de la maladie après une analyse clinique par le médecin et/ou des analyses biologiques, telles que imagerie par résonance magnétique, analyse des bandes oligoclonales dans le liquide céphalo-
5 rachidien, analyse de potentiels évoqués et le test de détection de gliotoxité appelé bio-essai, dont le principe est décrit dans la demande de brevet WO 98/11439 précédemment citée. Cette diminution des signes cliniques et effets pathologiques doit entraîner un bénéfice pour le patient (Schwartz et Lazar, 1995, Elements de statistique médicale et biologique, eds Flammarion ; Lazar et Schwartz, 1995, Eléments de
10 statistique médicale et biologique, eds Flammarion). La maladie étudiée de préférence est la sclérose en plaques.

On entend par composition à usage prophylactique et/ou thérapeutique, toute composition qui comprend un agent thérapeutiquement efficace. Ces agents thérapeutiques sont capables (i) d'influencer de manière qualitative et/ou quantitative
15 l'activité biologique et/ou la fonction des protéines d'intérêt identifiées dans la présente invention, de préférence l'activité gliotoxique et/ou (ii) de moduler et/ou d'inhiber l'expression de ces protéines et/ou (iii) de diminuer la concentration de ces protéines dans un compartiment extracellulaire et/ou intracellulaire, et/ou de substituer une forme non pathogène à une forme pathogène, par exemple mutée, d'une de ces protéines et/ou
20 de moduler leur fixation à au moins un de leur ligand ; ledit ligand étant une molécule qui répond aux critères précédemment décrits. Différents agents thérapeutiques sont produits en suivant les approches classiques largement décrites dans la littérature. Les différents groupes d'agents thérapeutiques définis à partir des protéines d'intérêt identifiées dans cette présente invention sont décrits ci-dessous. Leur activité ou
25 efficacité prophylactique et/ou thérapeutique est évaluée *in vitro* et/ou *in vivo*.

Evaluation de l'efficacité d'un agent thérapeutique *in vitro* : des échantillons d'urine d'individus sains et de patients atteints de la sclérose en plaque, de préférence en phase active, sont testés pour leur activité gliotoxique *in vitro* en suivant le protocole du bio-essai décrit dans la demande de brevet WO 98/11439,
30 précédemment citée. L'expérience est réalisée en parallèle en ajoutant ou non dans les échantillons d'urine testés l'agent thérapeutique dont l'efficacité est à tester. Des essais sont réalisés à différentes concentrations de cet agent, et après différents temps

d'incubation avec l'échantillon, à une température d'environ 37°C ou à température ambiante, pour chaque concentration d'agent testé, avant la réalisation du test bio-essai. L'activité gliotoxique est déterminée pour chaque échantillon brut ou purifié d'urine témoin et de patient en présence ou en absence de l'agent thérapeutique testé. Un agent
5 prophylactique et/ou thérapeutique pour la sclérose en plaques est un agent qui permet une diminution ou une inhibition de l'activité gliotoxique dans un fluide biologique des patients, en particulier dans l'urine. Cette diminution ou inhibition est évaluée par rapport à l'activité gliotoxique détectée dans le fluide biologique des patients SEP en absence de l'agent testé qui fixe la borne supérieure et par rapport à l'activité
10 gliotoxique détectée dans l'urine d'individu sain qui détermine la borne inférieure (Schwartz et Lazar, 1995, Elements de statistique médicale et biologique, eds Flammarion ; Lazar et Schwartz, 1995, Elements de statistique médicale et biologique, eds Flammarion). L'efficacité thérapeutique de plusieurs agents peuvent être évaluée en combinaison dans un même essai.

15 Evaluation de l'efficacité d'un agent thérapeutique utilisant un modèle animal : à un animal sont injectées des fractions d'urine purifiée et/ou au moins un polypeptide de l'invention et/ou au moins une protéine obtenue par recombinaison génétique qui correspond à au moins un polypeptide de l'invention et/ou au moins un polypeptide de synthèse dont la séquence en acides aminés correspond à la séquence
20 d'au moins un polypeptide de l'invention. Les injections sont effectuées, à différentes concentrations établies, à des animaux mammifères, tels que souris ou rat, de préférence un rat Lewis selon le protocole décrit dans la demande de brevet WO97/33466 citée précédemment. A des séries d'animaux sont injectées, par voie intradermique, intraveineuse, intrathécale, intracérébrale, intramusculaire, ou autres,
25 différentes concentrations d'une fraction d'urine brute ou purifiée ou d'au moins un polypeptide et/ou une protéine, tels que définis ci-dessus. Un contrôle négatif est effectué en parallèle. L'agent prophylactique et/ou thérapeutique à évaluer et ensuite injecté à différentes concentrations et par différentes voies d'administration à un animal mammifère, de préférence à une souris ou à un rat. Les injections sont réalisées
30 en une seule dose ou en doses répétées, avec différents temps d'intervalle entre chaque administration. Quelques heures à quelques semaines après l'administration, des

échantillons biologiques, de préférence du sang, du sérum, du liquide céphalo-rachidien, de l'urine sont prélevés. Sur ces échantillons sont réalisés :

- (i) une mesure de l'activité gliotoxique par le bio-essai, et/ou
- (ii) une mesure d'activité des polypeptides et/ou protéines d'intérêt de l'invention, seuls ou en combinaison comme décrit au moins dans : Li et al., 1983, Am J Hum Genet 35 :629-634 ; Li et al., 1988 J Biol Chem 263 : 6588-6591 ; Li et al., 1981 J Biol Chem 256 : 6234-6240 ; Li et al., 1976 J Biol Chem 251 :1159 ; Kase et al., 1996, FebsLetters 393 : 74-76 ; Kishimoto et al., 1992, J Lipid Res 33 : 1255-1267 ; O'Brien et al., 1991 Faseb J 5 : 301-308 ; Murthy et al., 1993 J Immunol 151 : 6291-6301 ;
10 Murao et al., 1990 Cell growth Differ 1 : 447-454, et/ou
- (iii) un dosage des polypeptides et/ou protéines d'intérêt, seuls ou en combinaison, par ELISA (Enzyme Linked-Immunosorbant Assay) et/ou Western Blot, en utilisant des anticorps ou des fragments d'anticorps capables de se fixer à au moins un des polypeptides et/ou protéines de l'invention, ou leur fragment, et/ou
- 15 iv) un dosage d'anticorps spécifiques des polypeptides et/ou protéines d'intérêt ou leurs fragments, seuls ou en combinaison ou le dosage d'au moins un ligand capable de se fixer aux polypeptides et/ou protéines d'intérêt ou leurs fragments, et/ou
- (v) un dosage de la réponse immune cellulaire « helper » et/ou cytotoxique induite contre les polypeptides et protéines d'intérêt ou leurs fragments et tout peptide
20 immunogène dérivant de ces polypeptides, protéines et fragments, en réalisant, par exemple, un test d'activation *in vitro* de cellules lymphocytes T " helper " spécifiques de l'antigène administré ; en quantifiant les lymphocytes T cytotoxiques selon la technique dite ELISPOT décrite par Scheibenbogen et al., 1997 Clinical Cancer Research 3 : 221-226. Une telle détermination est particulièrement avantageuse lorsque
25 l'on veut évaluer l'efficacité d'une approche vaccinale pour la mise en œuvre chez un patient donné ou pour diagnostiquer et/ou pronostiquer un état pathologique potentiel en cherchant à mettre en évidence une réponse immune naturellement développée par le patient contre l'antigène, les polypeptides, les protéines d'intérêt ou les fragments immunogènes dérivés de ces protéines.

30 Par « ligand capable de se fixer à une protéine », on entend toute molécule capable de reconnaître la protéine ou une partie de la protéine. Cela peut être vérifié par exemple *in vitro* par tests Elisa et/ou Western blot .

On désigne par « polypeptides et/ou protéines d'intérêt de l'invention » le fragment C-terminal du perlecan (SEQ ID N°2), le précurseur de la protéine plasmatiche de liaison au rétinol (SEQ ID N°4), la protéine activateur du GM2 (SEQ ID N° 8), la protéine mutée de l'activateur du GM2 (SEQ ID N° 9), la calgranuline B (SEQ ID N° 17), la saposine B (SEQ ID N° 24), les protéines ou fragments appartenant à la famille du précurseur de la protéine plasmatiche de liaison au rétinol (par exemple SEQ ID N° 5 à 7), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine activateur du GM2 (par exemple SEQ ID N° 10 à 16), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine calgranuline B (par exemple SEQ ID N° 18 à 23), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine saposine B (par exemple SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29.

L'animal est ensuite sacrifié et des coupes histologiques de différents tissus sont réalisées, de préférence des coupes de cerveaux. Différentes études et observations sont réalisées pour détecter et/ou quantifier les effets caractéristiques des polypeptides et/ou protéines actives associées à la fraction gliotoxique, c'est à dire une apoptose des cellules gliales, et/ou l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique, et/ou une démyélinisation. La présence ou l'expression des polypeptides et/ou protéines d'intérêt identifiées est également observée et/ou quantifiée dans ces tissus :

- (i) par des analyses d'immunohistologie classiques en utilisant des ligands des polypeptides et/ou protéines d'intérêt et/ou leurs fragments et/ou des anticorps monoclonaux ou polyclonaux ou des fragments desdits qui se lient aux polypeptides et/ou protéines d'intérêt, ou à leurs fragments, et/ou
- (ii) par des techniques d'hybridation *in situ* classiques en utilisant des fragments d'acides nucléiques ou des oligonucléotides définis à partir des séquences polypeptidiques et/ou protéiques d'intérêt ; et/ou
- (iii) par des techniques d'amplification par PCR et/ou RT-PCR *in situ* en utilisant des fragments d'acides nucléiques ou des amorces définis à partir des séquences polypeptidiques et/ou protéiques d'intérêt.

Par anticorps capable de se fixer à un polypeptide, à une protéine ou à leurs fragments, on entend tout anticorps monoclonal ou polyclonal et tout fragment

desdits anticorps capable de reconnaître le polypeptide, la protéine ou leurs fragments. La capacité des anticorps à reconnaître lesdits polypeptides, protéines ou leurs fragments est vérifiée *in vitro*, par exemple en ELISA et/ou Western Blot. Un anticorps capable de se fixer à la protéine saposine B (SEQ ID N° 24) ou à tout
5 fragment de cette protéine est décrit par Misasi et al. 1998, J. NeuroChem. 71 : 2313 et Klein et al. 1994, BBRC 200 : 1440-1448 ou peut être produit en utilisant les méthodes conventionnelles, par exemple celles référencées précédemment pour la production d'anticorps monoclonaux et polyclonaux, par immunisation à partir de la protéine naturelle, d'une protéine recombinante, d'un polypeptide de synthèse ou de leurs
10 fragments. Les peptides immunogènes pour la production d'anticorps monoclonaux anti-saposine B sont les peptides correspondant aux séquences SEQ ID N° 61 et SEQ ID N° 62.

Par exemple, un anticorps capable de se fixer à la protéine activatrice du GM2 (SEQ ID N° 8) ou à tout fragment de cette protéine est illustré par Yuziuk *et al.*,
15 1998 J Biol Chem 273 : 66-72 ou peut être produit en utilisant les méthodes conventionnelles connues de l'homme de l'art. Cet anticorps peut être par exemple produit après injection à des souris ou lapin de la protéine naturelle ou tout fragment, et/ou de la protéine recombinante ou tout fragment, et/ou de peptides définis et synthétisés à partir de la séquence protéique de la protéine. Les peptides immunogènes
20 utilisés pour la production d'anticorps monoclonaux anti-GM2 sont les peptides références SEQ ID N° 58, SEQ ID N° 59 et SEQ ID N° 60. Un anticorps capable de se fixer à la protéine Galgranuline B (SEQ ID N° 17) ou à tout fragment de cette protéine est décrit par Saintigny *et al.*, 1992 J Invest Dermatol 99 : 639-644 et Goebeler et al 1994 J Leukoc Biol 55 : 259-261, ou peut être produit en utilisant les méthodes
25 conventionnelles. Les peptides immunogènes pour la production d'anticorps monoclonaux anti-calgranuline B sont les peptides correspondant aux séquences SEQ ID N° 63, SEQ ID N° 64 et SEQ ID N° 65. Un anticorps capable de se fixer à la protéine mutée activatrice du GM2 (SEQ ID N°9) ou à tout fragment de cette protéine peut être produit en utilisant les méthodes conventionnelles définies ci dessus.

30 Par protéine naturelle et fragment, on entend toute protéine isolée, purifiée totalement ou partiellement obtenue à partir d'échantillon humain ou animal et tout fragment obtenu à partir de cette protéine. Par exemple, on obtient la protéine naturelle

correspondant à la saposine B (SEQ ID N° 24) en suivant la technique décrite par Waring et al. 1998 Mol Genet Metab 63 : 14-25 ; la protéine naturelle correspondant à la protéine activatrice du GM2 (SEQ ID N° 8) en suivant la technique décrite par DeGasperi et al., 1989 Biochem J 260 : 777-783, Vogel et al., 1987 Arch Biochem Biophys 259 : 627-638, Mitsuyama, 1983 Hokkaido Igaku Zasshi 58 : 502-512 ;
5 Hirabayashi et al 1983 J Neurochem 40 : 168-175, Conzelmann et al, 1979 Hoppe Seylers Z Physiol Chem 360 : 1837-1849, Li et al., 1976 J Biol Chem 251 : 1159-1163. La protéine naturelle correspondant à la calgranuline B (SEQ ID N° 17) est obtenue en suivant la technique décrite par Hitomi et al. 1996 J Cell Sci 109 : 805-815, Van den
10 Bos et al. 1998 Protein Expr Purif 13 : 313-318 et Raftery et al. 1996 Biochem J 316 : 285-293.

Par protéine recombinante ou fragment d'une protéine recombinante, on fait référence à toute protéine ou fragment de protéine produit dans une cellule procaryote ou eucaryote à partir d'une séquence nucléotidique codant pour la protéine
15 ou son fragment et transfectée dans la cellule, cette protéine ou son fragment étant ensuite purifiée. D'une manière générale, toute cellule issue d'un organisme procaryote ou eucaryote peut être utilisée dans le cadre de la présente invention, mais les cellules issues d'organismes eucaryotes sont préférées. On peut citer à titre d'exemple les cellules CHO, les cellules COS, les cellules Semliki. Aux fins de la présente invention,
20 ladite cellule peut être sauvage ou mutante. Par exemple, la protéine recombinante correspondant à la saposine B (SEQ ID N° 24) peut être obtenue en suivant les techniques décrites par Zaltash et al. 1998 Bebbs letter 423 : 1-4 et Qi et al. 1994 J Biol Chem 269 : 16746-16753. Une telle protéine recombinante est au moins disponible auprès de Kase et al. 1996 Febs Lett 393 : 74-76. La protéine recombinante
25 correspondant à la protéine activatrice du GM2 (SEQ ID N° 8) peut être produite par les techniques décrites par Yuziuk et al. 1998 J Biol Chem 273 : 66-72 et Bierfreund et al., 1999 Neurochem Res 24 : 295-300. La protéine recombinante correspondant à la calgranuline B (SEQ ID N° 17) peut être obtenue selon le protocole de Longbottom et al. 1992 Biochim Biophys Acta 1120 : 215-222, Raftery et al. 1999 Protein Expr Purif
30 15 : 228-235. Une telle protéine recombinante est disponible au moins auprès de Klempt et al. 1997 Febs Letter 408 : 81-84.

Par séquence nucléotidique d'ADN ou fragment nucléotidique d'ADN codant pour tout ou partie de la protéine saposine B (SEQ ID N°24), on entend la séquence d'acides nucléiques SEQ ID N° 53 ou un fragment de cette séquence. Par séquence ou fragment nucléotidique ARN codant pour tout ou partie de la protéine saposine B (SEQ ID N° 24), on entend toute séquence déduite de la séquence d'ADN SEQ ID N° 53, en tenant compte du code génétique et des phénomènes d'épissage.

Par séquence nucléotidique d'ADN ou fragment nucléotidique d'ADN codant pour tout ou partie de la protéine activatrice du GM2 (SEQ ID N° 8), on entend la séquence d'acides nucléiques SEQ ID N° 31 ou un fragment de cette séquence. Par séquence ou fragment nucléotidique d'ARN codant pour tout ou partie de la protéine activatrice du GM2 (SEQ ID N° 8), on entend toute séquence déduite de la séquence ADN SEQ ID N° 31, en tenant compte du code génétique et des phénomènes d'épissage.

Par séquence nucléotidique d'ADN ou fragment nucléotidique d'ADN codant pour tout ou partie de la protéine calgranuline B (SEQ ID N° 17), on entend la séquence d'acides nucléiques SEQ ID N° 42 ou un fragment de cette séquence. Par séquence ou fragment nucléotidique d'ARN codant pour tout ou partie de la protéine calgranuline B (SEQ ID N° 17), on entend toute séquence déduite de la séquence ADN SEQ ID N° 42, en tenant compte du code génétique et des phénomènes d'épissage.

Par séquence ou fragment nucléotidique codant pour tout ou partie de la protéine mutée (SEQ ID N° 9), on entend la séquence d'acides nucléiques déduite de la séquence SEQ ID N° 9, en tenant compte du code génétique. Par séquence ou fragment nucléotidique ARN codant pour tout ou partie de cette protéine mutée B (SEQ ID N° 9), on entend toute séquence déduite de la séquence ADN, en tenant compte du code génétique et des phénomènes d'épissage.

Par activité protéique, on entend une fonction caractéristique biologique de la protéine. Cette activité protéique peut être mise en évidence par des techniques connues de l'homme de l'art. Par exemple, l'activité de la saposine B (SEQ ID N° 24) et des protéines de la famille de la saposine B (par exemple SEQ ID N° 25 à 29), peut être détectée par la mise en œuvre des protocoles décrits par Li et al., 1983, Am J Hum Genet 35 :629-634.; Li et al., 1988 J Biol Chem 263 : 6588-6591, Li et al., 1981 J Biol Chem 256 : 6234-6240 et Li et al., 1976 J Biol Chem 251 :1159. Par activité de la

protéine activatrice du GM2 (SEQ ID N° 8) et des protéines de la même famille (par exemple SEQ ID N° 10 à 16), on entend au moins l'activité détectée par la mise en œuvre des protocoles décrits par exemple par Kase et al., 1996, Febs Letters 393 : 74-76, Kishimoto et al., 1992, J Lipid Res 33 : 1255-1267 et O'Brien et al., 1991 Faseb J 5 : 301-308. Par activité de la calgranuline B (SEQ ID N° 17) et les protéines de la même famille de la calgranuline b (par exemple SEQ ID N° 18 à 23) et toute, on entend au moins l'activité détectée par la mise en œuvre des protocoles décrits par exemple par Murthy et al., 1993 J Immunol 151 : 6291-6301 et Murao et al., 1990 Cell growth Differ 1 : 447-454.

10 L'obtention d'un modèle animal transgénique, de préférence murin, pour une pathologie humaine est techniquement réalisable. Brièvement, l'animal transgénique est produit en utilisant les techniques conventionnelles décrites et possède intégré dans son génome les acides nucléiques codant pour les protéines ou leurs fragments.

15 Evaluation de l'efficacité d'un agent thérapeutique et suivi thérapeutique *ex vivo*, chez l'homme :

les agents thérapeutiques à tester pour une activité thérapeutique et/ou pour un suivi thérapeutique sont administrés par différentes voies à l'homme, telles que les voies intradermique, intraveineuse, intramusculaire, intracérébrale, orale, ou autres.

20 Différentes doses sont administrées à l'être humain. Le dossier clinique du patient au moment de la première administration est parfaitement connu. Une ou plusieurs administrations peuvent être réalisées avec des temps d'intervalle différents entre chaque administration pouvant aller de quelques jours à quelques années. Des échantillons biologiques sont prélevés à des intervalles de temps déterminés après

25 administration de l'agent thérapeutique, de préférence du sang, du sérum, du liquide céphalo-rachidien et de l'urine. Différentes analyses sont réalisées à partir de ces échantillons. Juste avant la première administration de l'agent thérapeutique, ces prélèvements et ces mêmes analyses sont également réalisés. Un examen clinique et biologique classique (IRM, bandes oligoclonales dans le liquide céphalo-rachidien,

30 potentiels évoqués) est réalisé également en parallèle des analyses supplémentaires qui sont être décrites ci dessous, à différentes temps de l'analyse. Les analyses réalisées sont :

(i) une mesure de l'activité gliotoxique par le bio-essai à partir d'échantillons de sérum, de LCR et d'urine, et/ou

(ii) une mesure d'activité des protéines d'intérêt identifiées dans la présente invention seules ou en combinaison comme décrit par exemple par : Li et al., 1983, Am J Hum Genet 35 :629-634 ; Li et al., 1988 J Biol Chem 263 : 6588-6591 ; Li et al., 1981 J Biol Chem 256 : 6234-6240 ; Li et al., 1976 J Biol Chem 251 :1159 ; Kase et al., 1996, FebsLetters 393 : 74-76 ; Kishimoto et al., 1992, J Lipid Res 33 : 1255-1267 ; O'Brien et al., 1991 Faseb J 5 : 301-308 ; Murthy et al., 1993 J Immunol 151 : 6291-6301 ; Murao et al., 1990 Cell growth Differ 1 : 447-454, et/ou

(iii) un dosage des protéines d'intérêt ou de leurs fragments, seuls ou en combinaison, dans les échantillons de sang/sérum, LCR, urine par ELISA et/ou Western Blot, en utilisant des anticorps ou des fragments d'anticorps capables de se fixer à au moins une des protéines ou à un de leur fragment, et/ou

(iv) un dosage d'anticorps spécifiques des protéines d'intérêt ou de leurs fragments dans des échantillons de sang/sérum, LCR, urine, par ELISA et/ou Western blot en utilisant une protéine naturelle ou un fragment de la protéine naturelle et/ou une protéine recombinante ou un fragment de cette protéine recombinante, seuls ou en combinaison. De même un dosage de ligands capables de se fixer aux protéines d'intérêt identifiées, seules ou en combinaison, peut être réalisé, et/ou

(v) un dosage de la réponse immune cellulaire « helper » et/ou cytotoxique induite contre les protéines d'intérêt et tout peptide immunogène dérivant de ces protéines, par exemple en réalisant un test d'activation *in vitro* de cellules lymphocytes T spécifiques de l'antigène administré (exemple). Par exemple en réalisant un test d'activation *in vitro* de cellules lymphocytes T helper spécifiques de l'antigène administré (exemple) ; Par exemple en quantifiant les lymphocytes T cytotoxiques selon la technique dite ELISPOT décrite par Scheibenbogen et al., 1997 Clinical Cancer Research 3 : 221-226. Une telle détermination est particulièrement avantageuse lorsque l'on souhaite évaluer l'efficacité d'une approche vaccinale mise en œuvre chez un patient donné ou pour diagnostiquer un état pathologique potentiel chez un patient en cherchant à mettre en évidence une réponse immune naturellement développée par ledit patient contre l'antigène les protéines d'intérêt ou tout fragment immunogène dérivés de ces protéines, seuls ou en combinaison, et/ou

(vi) une détection de fragments d'ADN et/ou d'ARN codant pour les protéines ou un fragment des protéines d'intérêt par hybridation nucléotidique selon les techniques bien

connues de l'homme de l'art (Southern blot, Northern blot, ELOSA " Enzyme-Linked Oligosorbent Assay " (Katz JB et al., Am. J. Vet. Res., 1993 Dec ; 54 (12) :2021-6 et François Mallet et al., Journal of Clinical Microbiology, June 1993, p1444-1449)) et/ou par méthode d'amplification de l'ADN et/ou l'ARN , par exemple par PCR, RT-PCR, 5 en utilisant des fragments d'acides nucléiques codant pour la séquence des protéines d'intérêt, et/ou

(vii) par biopsie de tissus, de préférence du cerveau, et l'observation des effets caractéristiques des protéines actives associées à la fraction gliotoxique, c'est à dire une apoptose des cellules gliales et/ou l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique 10 et/ou l'observation de phénomènes de démyélinisation, et/ou

(viii) par biopsie de tissus ou sur cellules circulantes (sang, LCR), l'observation de la présence des protéines d'intérêt et l'estimation de leur expression par observation immunohistologique sur des coupes histologiques réalisées à partir des tissus, en utilisant des ligands et/ou des anticorps ou leurs fragments capables de se fixer aux 15 protéines d'intérêt, et/ou

(ix) par biopsie de tissus ou sur cellules circulantes (sang, LCR), l'observation de l'expression des protéines d'intérêt par hybridation in situ des molécules d'ARN codant pour les protéines d'intérêt en utilisant des acides nucléiques définis à partir des séquences des protéines d'intérêt, et/ou

20 (x) par biopsie de tissus ou sur cellules circulantes (sang, LCR), la détermination de l'expression des protéines d'intérêt par amplification de ces ARN par des techniques classiques, comme par exemple, la RT-PCR, en utilisant des acides nucléiques définis à partir des séquences des protéines d'intérêt.

On désigne par « polypeptides et/ou protéines d'intérêt de l'invention » le 25 fragment C-terminal du perlecan (SEQ ID N°2), le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol (SEQ ID N°4), la protéine activateur du GM2 (SEQ ID N° 8), la protéine mutée de l'activateur du GM2 (SEQ ID N° 9), la calgranuline B (SEQ ID N° 17), la saposine B (SEQ ID N° 24), les protéines ou fragments appartenant à la famille du précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol (par exemple 30 SEQ ID N° 5 à 7), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine activateur du GM2 (par exemple SEQ ID N° 10 à 16), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine calgranuline B (par exemple SEQ ID N° 18 à

23), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine saposine B (par exemple SEQ ID N° 25 à 29), et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29.

5 On désigne par séquence d'acides nucléiques ADN ou fragments codant pour les 'polypeptides et/ou protéines d'intérêt de l'invention' la séquence d'acides nucléiques codant pour le fragment C-terminal du perlecan (SEQ ID N°2), la séquence d'acides nucléiques codant pour le précurseur de la protéine plasmaticque de liaison au rétinol (SEQ ID N°4), la séquence d'acides nucléiques (SEQ ID N° 31) codant pour la
10 protéine activateur du GM2 (SEQ ID N° 8), la séquence d'acides nucléiques codant pour la protéine mutée de l'activateur du GM2 (SEQ ID N° 9), la séquence d'acides nucléique (SEQ ID N° 42) codant pour la calgranuline B (SEQ ID N° 17), la séquence d'acides nucléiques (SEQ ID N°53) codant pour la saposine B (SEQ ID N° 24), les séquences d'acides nucléiques ADN et/ou ARN (SEQ ID N° 30 à 57) codant pour les
15 protéines ou fragments appartenant à la famille du précurseur de la protéine plasmaticque de liaison au rétinol (par exemple SEQ ID N° 5 à 7), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine activateur du GM2 (par exemple SEQ ID N° 10 à 16), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine calgranuline B (par exemple SEQ ID N° 18 à 23), les protéines ou fragments
20 appartenant à la famille de la protéine saposine B (par exemple SEQ ID N° 25 à 29).

 Une protéine ou un variant d'une protéine choisie plus particulièrement parmi les séquences définies dans les identificateurs SEQ ID N°s 2, 4, 8, 9, 17 et 24 ou leurs fragments, ou parmi les séquences correspondant aux protéines des familles de ces dites séquences (par exemple SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ
25 ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 24, SEQ ID N° 25 à 29), et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, indépendamment ou en combinaison, présente un effet toxique directement ou indirectement, vis à vis de cellules, en particulier vis à vis des
30 cellules gliales, qui est mis en évidence par le bio-essai précité. Les auto-anticorps produits en réponse à la présence de cette protéine ou de ces protéines sont associés au processus auto-immun. Ainsi, la cible du ou des agent(s) thérapeutique(s) est par

exemple (i) la protéine naturelle ou les protéines naturelles ou leurs variants dans le but de réguler leur expression et/ou leur concentration intracellulaire et/ou leur concentration dans la circulation, (ii) un anticorps spécifique d'au moins une telle protéine. L'agent thérapeutique ou les agents thérapeutiques définis éliminent la cible
5 directement, par induction d'une réponse immune spécifique et/ou la neutralisent.

La présente invention concerne donc un matériel biologique pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement de mammifères atteints de pathologies dégénérative et/ou auto-immune et/ou neurologique, de préférence la sclérose en plaques, ladite composition comprenant :

10 (i) soit au moins une protéine naturelle et/ou une protéine recombinante ou leurs fragments dont la séquence correspond à tout ou partie des séquences référencées SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de
15 l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29), et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29,
20 indépendamment ou en combinaison,

(ii) soit au moins un ligand spécifique d'au moins une desdites protéines ou leurs fragments dont la séquence correspond à tout ou partie des séquences référencées SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie
25 parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29), et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au
30 moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, indépendamment ou en combinaison,

(iii) soit au moins un anticorps polyclonal ou monoclonal spécifique d'au moins une desdites protéines ou leurs fragments dont la séquence correspond à tout ou partie des séquences référencées SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29), et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et
5
10
avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, indépendamment ou en combinaison,

(iv) soit au moins une séquence d'acide nucléique comprenant au moins un gène d'intérêt thérapeutique dont la séquence nucléique est déduite des séquences d'ADN et d'ARN codant pour tout ou partie des protéines dont les séquences sont
15
référencées SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24, et les séquences d'ADN et/ou ARN (par exemple SEQ ID N° 30 à 57) codant pour tout ou partie des protéines appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du GM2, de la calgranuline B et de la saposine B, en association avec des éléments assurant
20
l'expression dudit gène d'intérêt thérapeutique *in vivo* dans des cellules cibles destinées à être génétiquement modifiées par la séquence nucléique du gène d'intérêt thérapeutique,

(v) soit au moins une cellule de mammifère ne produisant pas naturellement la protéine d'intérêt ou les protéines d'intérêt ou tout fragment de cette
25
ou de ces protéine(s) ou des anticorps spécifiques d'au moins une desdites protéines ou de ses fragments ladite cellule mammifère étant génétiquement modifiée *in vitro* par au moins une séquence d'acide nucléique ou un fragment d'une séquence d'acide nucléique ou une association de séquences d'acides nucléiques correspondant à des fragments d'acides nucléiques issus d'un même gène ou de gènes différents, la ou
30
lesdites séquences nucléiques étant déduite(s) des séquences d'ADN et ARN codant pour les protéines référencées SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24, et les séquences d'ADN et/ou ARN (par exemple SEQ ID N° 30 à 57) codant pour tout ou partie des protéines

appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du GM2, de la calgranuline B et de la saposine B, ledit gène d'intérêt thérapeutique codant pour tout ou partie de la protéine d'intérêt, d'un fragment de la protéine d'intérêt ou d'un anticorps spécifique de la protéine d'intérêt qui sera exprimé à la surface de ladite cellule de mammifère (Toes et al., 1997, PNAS 94 : 14660-14665). La composition pharmaceutique peut contenir un agent thérapeutique seul dirigé contre une cible seule ou des agents pris en combinaison dirigés contre plusieurs cibles.

On désigne par « polypeptides et/ou protéines d'intérêt de l'invention » le fragment C-terminal du perlecan (SEQ ID N° 2), le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol (SEQ ID N° 4), la protéine activateur du GM2 (SEQ ID N° 8), la protéine mutée de l'activateur du GM2 (SEQ ID N° 9), la calgranuline B (SEQ ID N° 17), la saposine B (SEQ ID N° 24), les protéines ou fragments appartenant à la famille du précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol (par exemple SEQ ID N° 5 à 7), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine activateur du GM2 (par exemple SEQ ID N° 10 à 16), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine calgranuline B (par exemple SEQ ID N° 18 à 23), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine saposine B (par exemple SEQ ID N° 25 à 29 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29.

A partir des connaissances des séquences en acides aminés des protéines d'intérêt identifiées dans la présente invention, il est à la portée de l'homme de l'art de définir et utiliser les molécules décrites ci dessus et/ou toute molécule capable de se fixer au dites molécules, et/ou toute molécule capable d'inhiber lesdites molécules. Ainsi la présente invention concerne l'utilisation de protéines naturelles et/ou recombinantes et/ou de polypeptides de synthèse et leurs fragments, de ligand capables de se fixer au dites protéines ou à leur(s) fragment(s), par exemple des anticorps ; de protéines inhibitrices de la fonction et/ou de l'expression et/ou de la fixation desdites protéines.

Utilisation de protéine(s) et/ou peptide(s) naturel(s) et/ou de protéine(s) recombinante(s) et/ou de polypeptide(s) de synthèse correspondant aux protéines d'intérêt identifiées dans la présente invention.

La présente invention concerne un matériel biologique pour la préparation
5 de compositions pharmaceutiques destinées au traitement de mammifères atteint de maladie auto-immune, de préférence la sclérose en plaques, comprenant :

(i) soit au moins une protéine naturelle et/ou une protéine recombinante et/ou un polypeptide de synthèse choisi parmi les protéines dont les séquences en acides aminés sont référencées SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24, et les séquences
10 peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29), et les séquences peptidiques qui
15 présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, seules ou en combinaison,

(ii) soit au moins un fragment naturel et/ou synthétique de ces protéines d'intérêt, par exemple un fragment immunogène capable d'induire une réponse
20 immune contre un polypeptide cible,

(iii) soit au moins un peptide mimotope défini à partir des séquences de référence SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur
25 de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29), et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, ou une
30 combinaison de mimotopes, capable d'induire une réponse immune contre le polypeptide cible,

(iv) soit au moins toute protéine ou peptide pouvant réguler *in vivo* la transcription et/ou la traduction des protéines d'intérêt (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29. L'administration de ces protéines et/ou peptides seuls ou en combinaison peut rétablir la concentration d'une protéine d'intérêt dans l'organisme.

La réponse immune dirigée contre un antigène spécifique peut être divisée en deux catégories distinctes, l'une mettant en jeu les anticorps (réponse immune de type humorale), l'autre les cellules effectrices cytotoxiques telles que par exemple les macrophages, les lymphocytes cytotoxiques (CTL) ou les cellules tueuses (NK) ainsi que les lymphocytes T « helper », notamment les lymphocytes T CD4+ (réponse immune de type cellulaire). Plus particulièrement, les deux types de réponse se distinguent en ce que les anticorps reconnaissent les antigènes sous leur forme tridimensionnelle alors que les lymphocytes T, par exemple, reconnaissent des portions peptidiques desdits antigènes, associés à des glycoprotéines codées par les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), notamment les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité de type I qui sont exprimés de façon ubiquitaire à la surface des cellules ou les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité de type II qui sont exprimés de façon spécifique à la surface des cellules impliquées dans la présentation des antigènes (APC). 1) Selon un premier aspect, la réponse immune de type cellulaire est caractérisée en ce que les cellules T de type CD4+ (cellules T helper), suite à un phénomène d'activation bien connu (pour une revue voir Alberola-lia 1997, Annu Rev Immunol 15, 125-154) produisent des cytokines qui à leur tour induisent la prolifération de cellules APC capables de produire lesdites cytokines, la différenciation cellulaire des lymphocytes B capables de produire des anticorps spécifiques de l'antigène, et la stimulation des lymphocytes T cytotoxiques (CTL). 2)

Selon un second aspect de la réponse immune cellulaire, les cellules effectrices cytotoxiques telles que par exemple les lymphocytes de type CD8+ (CTL) sont activés a) après interaction avec des peptides antigéniques fixés sur et présentés par les glycoprotéines portées par les cellules ubiquitaires et codées par les gènes appartenant au système CMH, et b) éventuellement par les cytokines produites par les CD4+.

La présente invention concerne l'administration d'une protéine ou d'un peptide dérivés des protéines d'intérêt (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24) ou de leur(s) fragment(s), et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmaticque de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29), et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, seuls ou en combinaison, pour la prophylaxie et/ou la thérapie d'une maladie auto-immune, telle que la sclérose en plaques. Ces protéines et peptides administrés sont caractérisés en ce que ils doivent avoir perdu leur activité toxique, par exemple leur activité gliotoxique, ou avoir perdu leur capacité à se fixer à un ligand, et peuvent induire significativement une réponse immune médiée par les lymphocytes T ou/et les anticorps dirigée contre cette protéine sont utilisés. De telles protéines sont dites 'modifiées', cependant leur immunogénicité est conservée. De telles molécules immunogéniques modifiées sont obtenues par un nombre de traitements conventionnels, par exemple la dénaturation chimique ou à la chaleur, la troncation ou la mutation avec délétion, insertion ou emplacement d'acides aminés. Un exemple de troncation consiste en la troncation d'acides aminés à l'extrémité carboxy-terminale pouvant aller jusqu'à 5-30 acides aminés. Les molécules modifiées peuvent être obtenues par des techniques synthétiques ou/et recombinantes ou par des traitements chimiques ou physiques des molécules naturelles.

Les protéines d'intérêt naturelles et/ou recombinantes identifiées dans la présente invention (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 25), et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies

parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29), et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, ou leur(s) fragment(s), sont utilisées en vaccination prophylactique et thérapeutique contre les maladies auto-immunes, de préférence la SEP. Un vaccin comprend une quantité immunogénique effective de la protéine immunogène en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable et éventuellement un adjuvant et/ou un diluant. Les véhicules, adjuvants et diluants pharmaceutiquement acceptables sont bien connus de l'homme du métier. On peut citer à titre de référence le Remington's Pharmaceutical Sciences. L'utilisation de compositions vaccinales est particulièrement avantageuse en association avec un diagnostic précoce de la maladie. La protéine immunogène est utilisée dans la préparation de médicament pour la vaccination prophylactique ou thérapeutique. Les protéines d'intérêt peuvent être éliminées de l'organisme sans induire d'effets secondaires indésirables. L'identification de telles protéines ou peptides vaccins est réalisée comme suit : les molécules candidates modifiées comme décrit précédemment (protéines naturelles, recombinantes, peptides) sont analysées dans un test fonctionnel pour vérifier qu'elles ont perdues leur toxicité, par exemple leur activité gliotoxique en utilisant le test appelé bio-essai, et pour vérifier leur immunogénicité (i) en réalisant un test *in vitro* de prolifération de lymphocytes T CD4+ spécifiques de l'antigène administré (T cell assay) ou un test *in vitro* de cytotoxicité des lymphocytes CD8+ spécifiques de l'antigène administré et (ii) en mesurant entre autre le taux d'anticorps circulants dirigés contre la protéine naturelle. Ces formes modifiées sont utilisées pour immuniser des hommes par des procédures standard avec des adjuvants appropriés.

Les vaccins préparés sont injectables, c'est-à-dire en solution liquide ou en suspension. En option, la préparation peut aussi être émulsifiée. La molécule antigénique peut être mélangée avec des excipients qui sont pharmaceutiquement acceptables et compatibles avec l'ingrédient actif. Des exemples d'excipients favorables sont l'eau, une solution saline, le dextrose, le glycérol, l'éthanol ou des

équivalents et leurs combinaisons. Si désiré, le vaccin peut contenir des quantités mineures de substances auxiliaires comme des agents "wetting" ou émulsifiants, des agents qui tamponnent le pH ou des adjuvants comme l'hydroxide d'aluminium, le dipeptide muramyl ou leurs variations. Dans le cas des peptides, leur couplage à une plus grosse molécule (KLH, toxine tétanique) augmente quelquefois l'immunogénicité. Les vaccins sont administrés conventionnellement par injection par exemple sous cutanée ou intramusculaire. Des formulations additionnelles favorables avec d'autres modes d'administration incluent des suppositoires et quelquefois des formulations orales.

En général la concentration du polynucléotide dans la composition utilisée pour une administration *in vivo* est de 0.1 µg /ml jusqu'à 20 mg /ml. Le polynucléotide peut être homologue ou hétérologue de la cellule cible dans laquelle il va être introduit.

La présente invention concerne également l'utilisation de vaccins incluant des molécules d'acides nucléiques qui codent pour les protéines d'intérêt ou des peptides immunogènes ou leur fragment(s), non actifs, correspondant aux protéines d'intérêt (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29. Les vaccins d'acides nucléiques, en particulier les vaccins ADN, sont administrés généralement en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable en injection intramusculaire.

A partir de la séquence en acides aminés des protéines d'intérêt décrites (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23,

SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, des peptides ou des fragments correspondant à tout ou partie de la séquence primaire de ces protéines peuvent être synthétisés par des méthodes classiques de synthèse peptidique ou obtenus par recombinaison génétique.

Des protéines recombinantes correspondante aux protéines d'intérêt, produites dans un système cellulaire procaryote ou eucaryote, sont disponibles auprès de différentes équipes et sont décrites dans la littérature. Elles peuvent être également produite par l'homme du métier à partir de la connaissance des séquences des gènes correspondants décrits dans la littérature et en tenant compte de la dégénérescence du code génétique. Toutes les séquences protéiques identifiées dans la présente invention sont ainsi susceptibles d'être obtenues par recombinaison génétique. Les gènes sont clonés dans des vecteurs adaptés. Des vecteurs différents sont utilisés pour transformer des cellules procaryotes (par exemple *E. coli*) et des cellules eucaryotes (par exemple cellules COS, CHO et cellules Simliki). Les protéines recombinantes correspondant aux protéines d'intérêt ou à des fragments des protéines d'intérêt peuvent être ainsi produits dans des systèmes cellulaires procaryotes et/ou encaryotes. Dans les cellules *E. coli*, les protéines recombinantes sont produites avec une queue poly-histidine. La fraction protéique insoluble est solubilisée dans de l'urée 8M. L'enrichissement du produit a été effectué sur résine chélatée au nickel (Qiagen). La colonne a été lavée avec des concentrations décroissantes d'urée. L'élution a été faite avec de l'imidazole en l'absence d'urée. La séquence complète des protéines d'intérêt peut être également clonée dans un plasmide adapté puis transférée dans le virus de la vaccine pour obtenir un virus recombinant.

Utilisation de ligands capables de se fixer aux protéines d'intérêt identifiées dans la présente invention.

La présente invention concerne un matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées au traitement de mammifères atteint de maladie auto-immune, de préférence la sclérose en plaques, comprenant :

(i) soit au moins un ligand capable de se fixer aux protéines et/ou fragments des protéines choisies parmi les protéines cibles SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 14 et

24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, le ligand étant capable ou non d'inhiber l'activité protéique,

(ii) soit au moins un anticorps polyclonal ou monoclonal capable de se fixer à au moins une protéine ou un de ses fragments choisie parmi les protéines cibles SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 14 et 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29. Cet anticorps peut être ou non neutralisant, c'est-à-dire capable ou non d'inhiber l'activité de la protéine d'intérêt. Le ligand peut être choisi parmi toute molécule ou fragment molécule capable de se fixer aux protéines cibles, par exemple les récepteurs de ces protéines, les cofacteurs de ces protéines, les anticorps polyclonaux ou monoclonaux capables de se fixer aux protéines ou tout fragment de ces protéines.

Ces anticorps sont très utiles notamment pour permettent la mise en œuvre de compositions thérapeutiques car ils conduisent par exemple, à des réactions immunes, dirigées spécifiquement à l'encontre d'épitopes immunodominants ou contre des antigènes présentant une grande variabilité. On administre chez le patient soit des anticorps solubles neutralisants pour inhiber leur fonction, soit des anticorps solubles spécifiques pour éliminer le peptide par formation de complexes immuns. L'invention décrit l'utilisation d'anticorps capables de reconnaître spécifiquement au moins une protéine décrite dans la présente invention pour le traitement et /ou pour le suivi

thérapeutique de maladie dégénérative et ou neurologique et ou auto-immune, de préférence la sclérose en plaques. Ces anticorps sont polyclonaux et de préférence monoclonaux. De préférence ces anticorps reconnaissent le site actif de la protéine et en se fixant, inhibe la fonction de la protéine. La capacité de l'anticorps à se fixer spécifiquement à la protéine est analysé par des techniques conventionnelle décrites, comme par exemple par des tests ELISA ou de Western blot en utilisant la protéine ou le peptide immunogène naturel ou synthétique. Le titre de l'anticorps est déterminé. La capacité de l'anticorps à neutraliser la fonction de la protéine peut être analysée par différents moyen, par exemple en déterminant la diminution de l'activité de la protéine ou du peptide immunogène en présence de l'anticorps, de préférence en déterminant la diminution de l'activité gliotoxique en utilisant le test bio-essai *in vitro*.

Par exemple, les anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine cible ou une partie de cette protéine sont produits par des techniques conventionnelles utilisées pour produire des anticorps contre des antigènes de surface. Des souris ou des lapins sont immunisées (i) soit avec la protéine naturelle ou recombinante d'intérêt, (ii) soit avec tout peptide immunogène de cette protéine d'intérêt, (iii) soit avec des cellules murines qui expriment la protéine ou le peptide d'intérêt et les molécules du CMHII. La lignée murine Balb/c est la plus fréquemment utilisée. L'immunogène est également un peptide choisi parmi les peptides définis à partir des séquences primaires des protéines d'intérêt. Par exemple, l'immunogène suivant a été préparé : les peptides SEQ ID N°s 58, 59, 60 issus de la séquence du précurseur du ganglioside GM2, les peptides SEQ ID N°s 61, 62 issus de la séquence de la saposine B et les peptides SEQ ID N°s 63, 64, 65 issus de la calgranuline B ont été couplé à de l'hémocyanine de Lymphet Keyhole, en abrégé peptide-KLH, comme support pour son utilisation en immunisation, ou couplé à de l'albumine de sérique humaine, en abrégé peptide-HSA. Les animaux ont été soumis à une injection de peptide-KLH ou de peptide-HSA en utilisant de l'adjuvant complet de Freund (IFA). Les sérums et les surnageants de culture d'hybridome issus des animaux immunisés avec chaque peptide ont été analysés pour la présence d'anticorps anti-protéines par un test ELISA utilisant les protéines initiales. Les cellules spléniques de ces souris ont par conséquent été récupérées et fusionnées avec des cellules de myélome. Le polyéthylèneglycol (PEG) est l'agent de fusion le plus fréquemment utilisé. Les hybridomes produisant les

anticorps les plus spécifiques et les plus sensibles sont sélectionnés. Les anticorps monoclonaux peuvent être produits *in vitro* par culture cellulaire des hybridomes produits ou par récupération de liquide d'ascite murin après injection intrapéritonéale des hybridomes chez la souris. Quel que soit le mode de production en surnageant ou en ascite, il importe ensuite de purifier l'anticorps monoclonal. Les méthodes de purification utilisées sont essentiellement la filtration sur gel échangeur d'ions ou par chromatographie d'exclusion, voire l'immunoprécipitation. Pour chaque anticorps il faut choisir la méthode qui permettra d'obtenir le meilleur rendement. Un nombre suffisant d'anticorps anti-protéines sont criblés dans des tests fonctionnels pour identifier les anticorps les plus performants pour fixer la protéine d'intérêt et/ou pour bloquer l'activité de la protéine d'intérêt. Les anticorps monoclonaux sélectionnés sont humanisés par des méthodes standard de « CDR grafting » (protocole réalisé par de nombreuses compagnies, sous forme de service). Ces anticorps humanisés peuvent être testés cliniquement chez le patient. L'efficacité de ces anticorps peut être suivie par des paramètres cliniques.

La production *in vitro* d'anticorps, de fragments d'anticorps ou de dérivés d'anticorps, tels que les anticorps chimères, produits par génie génétique, dans des cellules eucaryotes a été décrite (EP 120 694 ou EP 125 023) et est aussi applicable à la présente invention.

Utilisation de molécules inhibitrices des protéines d'intérêt identifiées dans la présente invention.

La présente invention concerne un matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées au traitement de mammifères atteint de maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, de préférence la sclérose en plaques, ladite composition comprenant (i) soit au moins une molécule inhibitrice de la fonction d'au moins une protéine choisie parmi les protéines identifiées dans la présente invention (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au

moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, par exemple inhibitrice de l'activité gliotoxique, (ii) soit au moins une molécule régulatrice de l'expression d'au moins une protéine choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, par exemple pour bloquer la transcription ou la traduction, (iii) soit au moins une molécule régulatrice du métabolisme d'au moins une protéine choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, (iv) soit au moins une molécule régulatrice de l'expression et/ou du métabolisme d'un ligand d'au moins une protéine choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 à 29 et les séquences peptidiques qui présentent au

moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, par exemple un récepteur ou un cofacteur. On peut penser que ces protéines de l'organisme humain peuvent être inhibées sans effet secondaire.

5 Un autre aspect important de l'invention concerne l'identification et l'évaluation de l'efficacité thérapeutique de substances naturelles et/ou synthétiques (i) capables de bloquer et/ou d'inhiber l'activité des protéines d'intérêt de l'invention et/ou de leur fragment : SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies
10 parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmaticque de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au
15 moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29 et/ou (ii) capables d'inhiber leur métabolisme tels les inhibiteurs du métabolisme correspondant, les inhibiteurs d'enzymes activées par les coenzymes, (iii) capables de réguler l'expression des protéines d'intérêt (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même
20 famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmaticque de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 %
25 d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, (iv) capables d'inhiber la fonction et/ou l'expression des ligands des protéines d'intérêt SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même
30 famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmaticque de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences

peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, comme par exemple des récepteurs. Ces substances peuvent être utilisées dans des traitements prophylactiques et thérapeutiques de la maladie. L'invention concerne également des méthodes pour traiter et prévenir une maladie auto-immune, par exemple la SEP, en administrant des quantités effectives de ces substances. Les substances peuvent être des protéines, des anticorps, de petites molécules synthétiques ou naturelles, des dérivés des protéines identifiées dans cette invention, des lipides, des glycolipides etc... Les petites molécules peuvent être criblées et identifiées en grande quantité en utilisant des bibliothèques combinatoires chimiques. L'invention concerne également des compositions pharmaceutiques comprenant ces substances en association avec des carriers physiologiques acceptables, et des méthodes pour la préparation de médicaments à utiliser en thérapie ou en prévention de maladies auto-immunes dont la SEP en utilisant ces substances.

Pour identifier des molécules inhibitrices de faible poids moléculaire comme des drogues candidates pour les maladies dégénératives et/ou neurologiques et/ou auto-immunes, telles que la sclérose en plaques, on utilise les tests et protocoles décrits dans précédemment et dans les demandes de brevet incorporés à titre de référence, en utilisant des échantillons prélevés du patient non traité ou traité, du modèle animal non traité ou traité, ou de tissus du modèle animal non traité ou traité. Cet aspect de l'invention inclue également un procédé pour identifier des substances capables de bloquer ou d'inhiber l'activité des protéines d'intérêt, comprenant l'introduction de ces substances dans un test *in vitro* ou dans un modèle animal *in vivo*. Les molécules sélectionnées sont testées à différentes concentrations. Ces inhibiteurs sont aussi testés dans des essais de toxicité et pharmacocinétique pour savoir si ils peuvent représenter des drogues candidates valables. Les substances testées pour l'inhibition ou le blocage des activités protéiques ou de l'expression des protéines, dans ces procédures de criblage peuvent être des protéines, des anticorps, des fragments d'anticorps, de petites molécules synthétiques ou naturelles, des dérivés des protéines d'intérêt, etc Les petites molécules peuvent être criblées et identifiées en grande quantité en utilisant des bibliothèques combinatoires chimiques.

A titre d'exemple, on peut citer comme substances inhibitrices :

Les inhibiteurs des protéines identifiées dans la présente invention (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24), les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmaticque de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les inhibiteurs des fragments desdites protéines. Ces inhibiteurs peuvent être compris dans une composition prophylactique et thérapeutique, en particulier pour le traitement de la sclérose en plaques. Par exemple, la lycorine, alcaloïde extrait de Amaryllidaceae (ex : Crinum Asiaticum) est utilisée *in vitro* à une concentration comprise entre 0.1 et 0.5 µg /ml et *in vivo* à une concentration comprise entre 0.1 et 1 mg / kg /jour. Par exemple, le Rolipram (nom commercial) et l'Ibudilast (nom commercial), qui sont deux molécules de la même famille des inhibiteurs des phosphodiesterases 4(PDE4) sont utilisées *in vitro* à des concentrations comprises entre 1 et 10 µM/l et *in vivo* à des concentrations comprises entre environ 10 mg/kg/jour.

➤ A partir des séquences d'acides aminés des protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24_ et des séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmaticque de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29)_il est évident que l'on peut déduire les séquences nucléotidiques ADN et ARN (SEQ ID N° 30, 31, 42, 53) correspondant aux protéines d'intérêt et les séquences codant pour les protéines de la famille de ces protéines d'intérêt (par exemple SEQ ID N° 32 à 41, SEQ ID N° 43 à 52, SEQ ID N° 54 à 57, SEQ ID N° 66 à 67), en tenant compte du code génétique et de sa dégénérescence. Ainsi la présente invention concerne l'utilisation de ces séquences nucléotidiques sous forme :

- de séquences anti-sens,
- de séquences codant pour un gène thérapeutique,

- de séquences pouvant être contenue dans un vecteur pour la réalisation de transformation cellulaire *ex vitro* et ou *in vivo* (thérapie génique).

Utilisation d'acides nucléiques déduits des séquences en acides aminés des protéines d'intérêt identifiées dans la présente invention : acides nucléiques anti-
5 sens et/ou codant pour un gène thérapeutique.

La présente invention concerne un matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées au traitement de mammifères atteint de maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, en particulier la sclérose en plaques, la composition comprenant (i) soit au moins une séquence d'acide
10 nucléique capable de s'hybrider à une séquence d'acides nucléiques codant pour les protéines d'intérêt (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B
15 (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, ou leur(s) fragment(s), (ii) soit au moins une séquence d'acide nucléique
20 comprenant au moins un gène d'intérêt thérapeutique codant pour les protéines ou un fragment de protéines (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24), les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B
25 (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et des éléments assurant l'expression dudit gène *in vivo* dans des cellules cibles
30 destinées à être génétiquement modifiées par ladite séquence nucléique.

Par séquence d'acide nucléique, on entend un fragment d'ADN et/ou d'ARN, double brin ou simple brin, linéaire ou circulaire, naturel et isolé ou de

synthèse, désignant un enchaînement précis de nucléotides, modifiés ou non, permettant de définir un fragment ou une région d'un acide nucléique choisi dans le groupe consistant en un ADNc ; un ADN génomique ; un ADN plasmidique ; un ARN messager. Ces séquences d'acides nucléiques sont déduites de la séquence d'acides aminés des protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmaticque de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, en utilisant le code génétique. En raison de la dégénérescence du code génétique l'invention englobe également des séquences équivalentes ou homologues. Ces séquences définies permettent à l'homme de l'art de définir lui-même les acides nucléiques adaptés.

Aussi, la présente invention concerne un matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques comprenant au moins une séquence d'acide nucléique capable de s'hybrider à une séquence d'acides nucléiques codant pour les protéines d'intérêt ou leur(s) fragment(s) (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmaticque de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29.

L'invention consiste à définir et utiliser des molécules d'acides nucléiques complémentaires des séquences ADN et/ou ARN codant pour les protéines d'intérêt ou leur(s) fragment(s). Ces fragments correspondent à des molécules anti-sens ou ribozyme et peuvent être synthétisés à l'aide de synthétiseurs automatiques, tels que

ceux commercialisés par la société Applied Biosystem. L'invention décrit l'utilisation de ces acides nucléiques capables de s'hybrider dans des conditions stringentes à l'ADN ou et ARN codant pour les protéines de l'invention ou pour leu(s) fragment(s). Des conditions de stringence caractéristiques sont celles qui correspondent à une
5 combinaison de la température et de la concentration saline choisie approximativement entre 12 à 20°C sous le T_m (« melting temperature ») de l'hybride à l'étude. De telles molécules sont synthétisées et peuvent être marquées en utilisant des méthodes de marquage conventionnelles utilisées pour les sondes moléculaires, ou peuvent être utilisées comme amorces dans les réactions d'amplification. Les séquences qui
10 présentent au moins 90% d'homologie par rapport à une séquence de référence font également partie de l'invention, de même que les fragments de ces séquences qui présentent au moins 20 nucléotides et de préférence 30 nucléotides contigus homologues par rapport à une séquence de référence. Afin de réduire la proportion de peptides naturels ou variants, il est possible d'envisager une approche anti-sens et/ou
15 ribozyme. Une telle approche est largement décrite dans la littérature. Bien entendu, de telles molécules anti-sens peuvent constituer en tant que telles des vecteurs. On peut également utiliser des vecteurs qui comprennent une séquence d'acides nucléique qui code pour un anti-sens.

La présente invention concerne un matériel biologique pour la préparation
20 de compositions pharmaceutiques destinées au traitement de mammifères atteint de maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, telle que la sclérose en plaques, ladite composition comprenant au moins une séquence d'acide nucléique contenant au moins un gène d'intérêt thérapeutique et des éléments assurant l'expression dudit gène *in vivo* dans des cellules cibles destinées à être génétiquement
25 modifiées par ladite séquence nucléique.

Ces séquences d'acides nucléiques et/ou vecteurs (anti-sens ou codant pour une protéine ou un fragment d'une protéine) permettent de cibler les cellules dans lesquelles le peptide est exprimé, telles que les cellules macrophages : (i) soit par l'utilisation d'une molécule de ciblage introduite sur le vecteur, (ii) soit par l'utilisation
30 d'une propriété particulière de ces cellules.

Utilisation de vecteurs comprenant un gène d'intérêt thérapeutique correspondant aux gènes des protéine d'intérêt identifiées dans la présente invention.

La présente invention concerne un matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées à la prévention et au traitement de maladies dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, telles que la sclérose en plaques, la composition comprenant une séquence d'acide nucléique comprenant un gène d'intérêt thérapeutique et des éléments d'expression dudit gène d'intérêt. Les gènes peuvent être non mutés ou mutés. Ils peuvent également consister en des acides nucléiques modifiés de sorte qu'il ne leur est pas possible de s'intégrer dans le génome de la cellule cible ou des acides nucléiques stabilisés à l'aide d'agents, tels que la spermine.

Un tel gène d'intérêt thérapeutique code notamment :

(i) soit au moins pour une protéine choisie parmi les protéines identifiées dans la présente invention (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, ou leur(s) fragment(s),

(ii) soit au moins pour tout ou partie d'un anticorps polyclonal ou monoclonal capable de se fixer à au moins une protéine ou un fragment de protéine choisi parmi les protéines identifiées dans la présente invention (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29. Il peut notamment s'agir d'anticorps transmembranaire natif, ou de fragment ou dérivé d'un tel anticorps, pour autant que

ledit anticorps, fragment ou dérivé d'anticorps soit exprimé à la surface de la cellule cible du mammifère génétiquement modifiée et soit capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique ou d'un lymphocyte T helper impliqué dans le procédé d'activation d'une telle cellule.

5 (iii) soit au moins pour une molécule inhibitrice d'au moins une protéine ou de ses fragments, ladite protéine étant choisie parmi les protéines identifiées (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de
10 l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29; les
15 protéines inhibitrices de la fonction et/ou du métabolisme et/ou de la fixation des protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par
20 exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29,

(iv) soit au moins pour un ligand ou toute partie d'un ligand capable de se
25 fixer à au moins une protéine ou un fragment de protéine choisi parmi les protéines identifiées (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par
30 exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 %

d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et/ou d'inhiber sa fonction.

Plus particulièrement, par fragment d'anticorps, on entend les fragments F(ab)₂, Fab', Fab, sFv (Blazar et al., 1997, Journal of Immunology 159 : 5821-5833 ;
5 Bird et al., 1988 Science 242 : 423-426) d'un anticorps natif et par dérivé on entend, par exemple, un dérivé chimérique d'un tel anticorps (voir par exemple les chimères des anticorps antiCD3 Souris/Homme dans Arakawa et al., 1996 J Biochem 120 : 657-662 ou les immunotoxines telles que sFv-toxine de Chaudary et al 1989, Nature 339 : 394-397). Par anticorps transmembranaire on entend un anticorps dont au moins la
10 région fonctionnelle capable de reconnaître et de se fixer à son antigène spécifique est exprimée à la surface des cellules cibles pour permettre lesdites reconnaissance et fixation. Plus particulièrement, les anticorps selon la présente invention consistent en des polypeptides de fusion comprenant les amino acides définissant ladite région fonctionnelle et une séquence d'acides aminés (polypeptide transmembranaire)
15 permettant l'ancrage au sein de la double couche lipidique membranaire de la cellule cible ou à la surface externe de cette bi-couche. Les séquences nucléiques codant pour de nombreux polypeptides transmembranaires sont décrites dans la littérature. Selon un cas tout à fait avantageux, la séquence d'acide nucléique codant pour la chaîne lourde de l'anticorps est fusionnée avec la séquence d'acide nucléique codant pour un dit
20 polypeptide transmembranaire.

Par éléments assurant l'expression dudit gène *in vivo* on fait notamment référence aux éléments nécessaires pour assurer l'expression dudit gène après son transfert dans une cellule cible. Il s'agit notamment des séquences promotrices et/ou des séquences de régulation efficaces dans ladite cellule, et éventuellement les
25 séquences requises pour permettre l'expression à la surface des cellules cibles dudit polypeptide. Le promoteur utilisé peut être un promoteur viral, ubiquitaire ou spécifique de tissu ou encore un promoteur synthétique. A titre d'exemple, on mentionnera les promoteurs tels que les promoteurs des virus RSV (Rous Sarcoma Virus), MPSV, SV40 (Simian Virus), CMV (Cytomegalovirus) ou du virus de la
30 vaccine, les promoteurs du gène codant pour la créatine kinase musculaire, pour l'actine. Il est en outre possible de choisir une séquence promotrice spécifique d'un

type cellulaire donné, ou activable dans des conditions définies. La littérature procure un grand nombre d'informations relatives à de telles séquences promotrices.

Par ailleurs, ledit acide nucléique peut comprendre au moins deux séquences, identiques ou différentes, présentant une activité de promoteur transcriptionnel et/ou au moins deux gènes, identiques ou différents, situés l'un par rapport à l'autre de manière contiguë, éloignée, dans le même sens ou dans le sens inverse, pour autant que la fonction de promoteur transcriptionnel ou la transcription desdits gènes ne soit pas affectée.

De même dans ce type de construction d'acide nucléique, il est possible d'introduire des séquences nucléiques « neutres » ou introns qui ne nuisent pas à la transcription et sont épissées avant l'étape de traduction. De telles séquences et leurs utilisations sont décrites dans la littérature (référence : demande de brevet PCT WO 94/29471).

Ledit acide nucléique peut également comprendre des séquences requises pour le transport intracellulaire, pour la répllication et/ou pour l'intégration, pour la transcription et/ou la traduction. De telles séquences sont bien connues de l'homme de l'art.

Par ailleurs, les acides nucléiques utilisables selon la présente invention peuvent également être des acides nucléiques modifiés de sorte qu'il ne leur est pas possible de s'intégrer dans le génome de la cellule cible ou des acides nucléiques stabilisés à l'aide d'agents, tels que par exemple la spermine, qui en tant que tels n'ont pas d'effet sur l'efficacité de la transfection.

Selon un mode de réalisation de l'invention, la séquence d'acide nucléique est une séquence d'ADN ou ARN nue, c'est à dire libre de tout composé facilitant son introduction dans les cellules (transfert de séquence d'acide nucléique). Toutefois, selon un second mode de réalisation de l'invention, afin de favoriser son introduction dans les cellules cibles et afin d'obtenir les cellules génétiquement modifiées de l'invention, cette séquence d'acide nucléique peut être sous la forme d'un « vecteur », et plus particulièrement sous la forme d'un vecteur viral, tel que par exemple un vecteur adénoviral, rétroviral, un vecteur dérivé d'un poxvirus, notamment dérivé du virus de la vaccine ou du Modified Virus Ankara (MVA) ou d'un vecteur non viral tel que, par exemple, un vecteur consistant en au moins une dite séquence d'acide

nucléique complexée ou conjuguée à au moins une molécule ou substance porteuse sélectionnée parmi le groupe consistant en un amphiphile cationique, notamment un lipide cationique, un polymère cationique ou neutre, un composé polaire pratique notamment choisi parmi le propylène glycol, le polyéthylène glycol, le glycérol, l'éthanol, la 1-méthyl L-2-pyrrolidone ou leurs dérivés, et un composé polaire aprotique notamment choisi parmi le diméthylsulfoxyde (DMSO), le diéthylsulfoxyde, le di-n-propylsulfoxyde, le diméthylsulfone, le sulfolane, la diméthylformamide, le diméthylacetamide, la tetraméthylurée, l'acétonitrile ou leurs dérivés. La littérature procure un nombre important d'exemples de tels vecteurs viraux et non viraux.

De tels vecteurs peuvent en outre et de préférence comprendre des éléments de ciblage pouvant permettre de diriger le transfert de séquence d'acide nucléique vers certains types cellulaires ou certains tissus particuliers tels que les cellules cytotoxiques et les cellules présentatrices de l'antigène). Ils peuvent également permettre de diriger le transfert d'une substance active vers certains compartiments intracellulaires préférés tel que le noyau, les mitochondries ou les peroxysomes, par exemple. Il peut en outre s'agir d'éléments facilitant la pénétration à l'intérieur de la cellule ou la lyse de compartiments intracellulaires. De tels éléments de ciblage sont largement décrits dans la littérature. Il peut par exemple s'agir de tout ou partie de lectines, de peptides, notamment le peptide JTS-1 (voir demande de brevet PCT WO 94/40958), d'oligonucléotides, de lipides, d'hormones, de vitamines, d'antigènes, d'anticorps, de ligands spécifiques de récepteurs membranaires, de ligands susceptibles de réagir avec un anti-ligand, de peptides fusogènes, de peptides de localisation nucléaire, ou d'une composition de tels composés.

Utilisation de cellules transformées *in vivo* après injection de vecteurs contenant au moins un gène d'intérêt thérapeutique défini à partir des protéines d'intérêt identifiées dans la présente invention (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 %

d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29.

La présente invention concerne un matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinée à la prévention et au traitement de mammifères atteint de maladies dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, de préférence la sclérose en plaques, la composition comprenant au moins un vecteur contenant un gène thérapeutique comme décrit ci-dessous, capable d'être introduit dans une cellule cible *in vivo* et d'exprimer le gène d'intérêt thérapeutique *in vivo*. L'avantage de cette invention repose sur la possibilité de maintenir sur le long terme un niveau basal de molécules exprimées dans le patient traité. Des vecteurs ou acides nucléiques codant pour des gènes d'intérêt thérapeutique sont injectés. Ces vecteurs et acides nucléiques doivent être transportés jusqu'aux cellules cibles et transfecter ces cellules dans lesquelles ils doivent être exprimés *in vivo*.

L'invention concerne l'expression *in vivo* de séquences nucléotidiques et/ou de vecteurs tels que désignés dans le paragraphe précédent, c'est-à-dire des séquences correspondant à des gènes d'intérêt thérapeutique codant notamment :

(i) soit au moins pour une protéine choisie parmi les protéines identifiées dans la présente invention (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, ou leur(s) fragment(s),

(i) soit au moins pour tout ou partie d'un anticorps polyclonal ou monoclonal capable de se fixer à au moins une protéine choisie parmi les protéines identifiées dans la présente invention (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la

calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une
5 quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29. Il peut s'agir d'anticorps transmembranaire natif, ou de fragment ou dérivé d'un tel anticorps, pour autant que ledit anticorps, fragment ou dérivé d'anticorps soit exprimé à la surface de la cellule cible de mammifère génétiquement modifiée et en ce que ledit anticorps est capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique
10 ou d'un lymphocyte T helper et impliqué dans le procédé d'activation d'une telle cellule. Il peut s'agir de fragments d'anticorps exprimés par des cellules capables de sécréter lesdits anticorps dans la circulation sanguine d'un mammifère ou patient porteur des cellules génétiquement modifiées par le gène codant pour l'anticorps,

(ii) soit au moins pour une molécule inhibitrice d'au moins une
15 protéine choisie parmi les protéines identifiées (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3,
20 SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29; protéine inhibitrice de la fonction et/ou du métabolisme et/ou de la fixation des protéines SEQ ID N° 2, 4,
25 8,9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID
30 N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement

au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29,

(iii) soit au moins pour un ligand ou toute partie du ligand capable de se fixer sur au moins une protéine choisie parmi les protéines identifiées (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et/ou d'inhiber sa fonction.

Selon un mode de réalisation particulier, il s'agit d'utiliser la thérapie génique de manière à diriger la réponse immune contre la protéine, le peptide ou la molécule d'intérêt cible, c'est-à-dire contre toute protéine choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, leur(s) fragment(s) et/ou contre toute molécule inhibitrice de la fonction et/ou de l'expression et/ou du métabolisme desdites protéines d'intérêt, et/ou des ligands desdites protéines comme par exemple les récepteurs. Pour cela il est évident que les cellules à cibler pour la transformation avec un vecteur sont des cellules appartenant au système immunitaire, soit des cellules de type lymphocytes (CD4/CD8), soit des cellules présentatrices de l'antigène (cellules dendritiques, macrophages, ...).

Selon un mode de réalisation particulier, on modifie génétiquement, notamment *in vivo*, les cellules présentatrices de l'antigène (CPA). Les CPA comme les

macrophages, les cellules dendritiques, les microgliocytes, les astrocytes jouent un rôle dans l'initiation de la réponse immunitaire. Elles sont les premiers composants cellulaires qui capturent l'antigène, l'apprête dans la cellule et expriment des molécules du CMHI et CMHII transmembranaires impliquées dans la présentation de l'immunogène aux
5 cellules T CD4+ et CD8+, elles produisent des protéines accessoires spécifiques qui participent à l'activation des cellules T (Debrick et al., 1991, J. Immunol 147 : 2846 ; Reis et al., 1993, J Ep Med 178 : 509 ; Kovacsovics-bankowski et al., 1993, PNAS 90 : 4942; Kovacsovics-bankowski et al., 1995 Science 267 : 243 ; Svensson et al., 1997, J Immunol 158 : 4229 ; Norbury et al., 1997, Eur J Immunol 27 : 280). Pour une
10 vaccination, il peut être avantageux de disposer d'un système de thérapie génique qui peut cibler le transfert de gène dans de telles cellules APC, c'est-à-dire un gène qui code pour un polypeptide qui peut, après sa production intracellulaire et son « processing », être présenté aux cellules CD8+ et/ou CD4+ par les molécules des complexes CMHI et CMHII respectivement à la surface de ces cellules.

15 On choisit d'exprimer à la surface des cellules CPA *in vivo* tout ou partie d'un anticorps et/ou d'un ligand comme par exemple un récepteur, capable de réagir avec la protéine ou le peptide cible choisis parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine
20 plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des
25 séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29. De telles cellules vont alors spécifiquement phagocyter ladite protéine ou ledit peptide, le « processer » de façon à ce que des fragments de ce peptide soient présentés à la surface des cellules présentatrices de l'antigène.

La littérature propose un grand nombre d'exemples de gènes codant pour
30 des anticorps capables de réagir avec des polypeptides ou récepteurs. Il est à la portée de l'homme de l'art d'obtenir les séquences d'acides nucléiques codant pour de tels anticorps. Citons par exemple les gènes codant pour les chaînes légère et lourde de

l'anticorps YTH 12.5 (anti-CD3) (Routledge et al. 1991, Eur J Immunol 21 : 2717-2725), de l'anti-CD3 selon Arakawa et al. (1996, J. Biochem. 120 : 657-662). Les séquences d'acide nucléique de tels anticorps sont aisément identifiables à partir des bases de données communément utilisées par l'homme du métier. Il est également possible à partir d'hybridomes disponibles auprès de l'ATCC de cloner les séquences d'acides nucléiques codant pour les chaînes lourdes et/ou légères de ces différents anticorps par les méthodes d'amplification telles que la RT-PCR à l'aide d'oligonucléotides spécifiques ou les techniques mettant en œuvre des banques d'ADNc (Maniatis et al., 1982, Molecular cloning, A laboratory manual CSH Laboratory, Cold Spring Harbor, New York). Les séquences ainsi clonées sont alors disponibles pour leur clonage dans des vecteurs. Selon un cas préféré de l'invention, la séquence d'acide nucléique codant pour la chaîne lourde de l'anticorps est fusionnée par recombinaison homologue avec la séquence d'acide nucléique codant pour un polypeptide transmembranaire tel que la glycoprotéine rabique ou la gp160 (Polydefkis et al., 1990, J Exp Med 171 : 875-887). Ces techniques de biologie moléculaire ont été parfaitement bien décrites.

On choisit d'exprimer à la surface des cellules CPA *in vivo* des fragments immunogènes correspondant à au moins une protéine choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29. Pour cela, on peut choisir de faire exprimer par le vecteur soit le polypeptide complet soit de manière préférée des polypeptides sélectionnés pour réagir avec des ligands et/ou récepteurs spécifiques. Le peptide immunogène codé par le polynucléotide introduit dans la cellule du vertébré *in vivo* peut être produit et/ou sécrété, apprêté puis présenté à une cellule présentatrice de l'antigène (APC) dans le contexte des molécules du CMH. Les APC ainsi transférées *in vivo* induisent une réponse immune dirigée contre

l'immunogène exprimé *in vivo*. Les APC possèdent différents mécanismes pour capturer les antigènes : (a) la capture des antigènes par des récepteurs membranaires comme les récepteurs aux immunoglobulines (Fc) ou pour le complément disponibles à la surface des granulocytes, des monocytes ou macrophages permettant une délivrance efficace de l'antigène dans les compartiments intracellulaires après phagocytose 5 médiée par les récepteurs. (b) l'entrée dans les APC par pinocytose en phase fluide, impliquant différents mécanismes : la micropinocytose c'est-à-dire la capture de petites vésicules (0.1 µm) par les puits recouverts de clathrine et la macropinocytose c'est-à-dire la capture de plus grosses vésicules (avec une taille variant entre 0.5 µm et environ 6 µm) (Sallusto et al. 1995, J Exp Med 182 : 389-400). Tandis que la micropinocytose existe de façon constitutive dans toutes les cellules, la macropinocytose est limitée à des types cellulaires, comme par exemple les macrophages, les cellules dendritiques, les astrocytes, les cellules épithéliales stimulées par des facteurs de croissance (Racoosin et al., J Cell Sci 1992, 102 : 867-880). Dans cette invention, on entend par 10 cellules capables de macropinocytose, les cellules qui peuvent réaliser les événements décrits ci-dessus et les cellules qui peuvent capturer des macromolécules de préférence entre 0.5 µm et environ 6 µm dans le cytoplasme.

Selon un mode de réalisation particulier, on modifie génétiquement notamment *in vivo*, les cellules effectrices cytotoxiques ou les lymphocytes T helper de 20 façon à ce qu'elles expriment à leur surface un polypeptide correspondant aux protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par 25 exemple SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, à des ligands desdites protéines, naturellement non exprimés par ces cellules, et capables 30 d'induire le procédé d'activation de telles cellules, par l'introduction dans ces cellules de séquences d'acide nucléique renfermant le gène codant pour un tel polypeptide. Conformément à la présente invention, il est également possible de sélectionner une

sequence d'acide nucléique contenant un gène d'intérêt thérapeutique codant pour tout ou partie d'un anticorps dirigé contre une protéine choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, susceptible d'être exprimé à la surface des cellules cibles du patient à traiter, ledit anticorps étant capable de se fixer à un polypeptide naturellement non exprimé par ces cellules effectrices cytotoxiques ou lymphocytes T helper.

Par cellules effectrices cytotoxiques, on entend désigner les macrophages, les astrocytes, les lymphocytes T cytotoxiques (TCL) et les cellules tueuses (NK) ainsi que leurs dérivés telles que par exemple les LAK (Versteeg 1992 *Immunology today* 13 : 244-247 ; Britten et al 1996, *Cancer* 77 : 1226-1243). Par 'lymphocytes T helper' on entend désigner notamment les CD4 qui permettent après activation la sécrétion de facteurs d'activation des cellules effectrices de la réponse immune. Les polypeptides et notamment les récepteurs exprimés à la surface de ces cellules et qui sont impliqués dans l'activation de telles cellules consistent notamment en tout ou partie du complexe TCR ou le CD3, tout ou partie des complexes CD8, CD4, CD28, LFA-1, 4-1BB (Melero et al., 1998, *Eur J Immunol* 28 : 1116-1121), CD47, CD2, CD1, CD9, CD45, CD30, CD40, tout ou partie des récepteurs de cytokines (Finke et al., 1998, *Gene therapy* 5 : 31-39), telles que IL-7, IL-4, IL-2, IL-15 ou GM-CSF, tout ou partie du complexe récepteur des cellules NK tel que par exemple NKAR, Nkp46, ... ; (Kawano et al., 1998 *Immunology* 95 : 5690-5693 ; Pessino et al., 1998 *J Exp Med* 188 : 953-960), Nkp44, tout ou partie des récepteurs de macrophages tels que par exemple le récepteur Fc (Deo et al., 1997, *Immunology Today* 18 : 127-135).

De nombreux outils ont été développés pour introduire différents gènes hétérologues et ou vecteurs dans des cellules, en particulier des cellules de mammifères. Ces techniques peuvent être divisées en deux catégories : la première

catégorie implique des technique physiques comme la micro-injection, l'électroporation ou le bombardement de particules. La seconde catégorie est basée sur l'utilisation de techniques en biologie moléculaire et cellulaire avec lesquelles le gène est transféré avec un vecteur biologique ou synthétique qui facilite l'introduction du matériel dans la cellule *in vivo*. Aujourd'hui, les vecteurs les plus efficaces sont les vecteurs viraux en particulier les adénoviraux et rétroviraux. Ces virus possèdent des propriétés naturelles pour traverser les membranes plasmiques, éviter la dégradation de leur matériel génétique et introduire leur génome dans le noyau de la cellule. Ces virus ont été largement étudiés et certains sont déjà utilisés expérimentalement dans des applications humaines en vaccination, en immunothérapie, ou pour compenser des déficiences génétiques. Cependant cette approche virale a des limitations notamment due à la capacité de clonage restreinte dans ces génomes viraux, le risque de disséminer les particules virales produites dans l'organisme et l'environnement, le risque de mutagenèse artéfactuelle par insertion dans la cellule hôte dans le cas des rétrovirus, et la possibilité d'induire une forte réponse immune inflammatoire *in vivo* pendant le traitement, ce qui limite le nombre d'injections possibles (Mc Coy et al. 1995, Human Gene Therapy 6 : 1553-1560 ; Yang et al., 1996 Immunity 1 : 433-422). D'autres systèmes alternatifs à ces vecteurs viraux existent. L'utilisation de méthodes non virales comme par exemple la co-précipitation avec le phosphate de calcium, l'utilisation de récepteurs qui miment les systèmes viraux (pour un résumé voir Cotten et Wagner 1993, Current Opinion in Biotechnology, 4 : 705-710), ou l'utilisation de polymères comme les polyamidoamines (Haensler et Szoka 1993, Bioconjugate Chem 4 : 372-379). D'autres techniques non virales sont basées sur l'utilisation de liposomes dont l'efficacité pour l'introduction de macromolécules biologiques comme l'ADN, l'ARN des protéines ou des substances pharmaceutiques actives a été largement décrite dans la littérature scientifique. Dans ce domaine des équipes ont proposé l'utilisation de lipides cationiques ayant une forte affinité pour les membranes cellulaires et/ou les acides nucléiques. En fait, il a été montré qu'une molécule d'acide nucléique elle-même pouvait traverser la membrane plasmique de certaines cellules *in vivo* (WO 90/11092), l'efficacité étant dépendante en particulier de la nature polyanionique de l'acide nucléique. Dès 1989 (Felgner et al., Nature 337 : 387-388) les lipides cationiques ont été proposés pour faciliter l'introduction de larges molécules

anioniques, ce qui neutralise les charges négatives de ces molécules et favorise leur introduction dans les cellules. Différentes équipes ont développés de tels lipides cationiques : le DOTMA (Felgner et al., 1987, PNAS 84 : 7413-7417), le DOGS ou Transfectam™ (Behr et al., 1989, PNAS 86 : 6982-6986), le DMRIE et le DORIE (Felgner et al., 1993 methods 5 : 67-75), le DC-CHOL (Gao et Huang 1991, BBRC 179 : 280-285), le DOTAP™ (McLachlan et al., 1995, Gene therapy 2 : 674-622) ou la Lipofectamine™, et les autres molécules décrites dans les brevets WO9116024, WO9514651, WO9405624. D'autres groupes ont développés des polymères cationiques qui facilitent le transfert de macromolécules en particulier des macromolécules anioniques dans les cellules. Le brevet WO95/24221 décrit l'utilisation de polymères dendritiques, le document WO96/02655 décrit l'utilisation du polyéthylèneimine ou polypropylèneimine et les document US-A-5595897 et FR 2719316, l'utilisation des conjugués polylysine.

Etant donné que l'on souhaite obtenir *in vivo* une transformation ciblée vers un type cellulaire donné, il est évident que le vecteur utilisé doit pouvoir être lui-même « ciblé », comme décrit ci dessus.

Utilisation de cellules transformées *in vitro* ou *ex vivo* avec des vecteurs contenant un gène d'intérêt thérapeutique défini par rapport aux protéines d'intérêt identifiées dans la présente invention (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29.

La présente invention concerne un matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinée à la prévention et au traitement de maladies dégénérative et ou neurologique et ou auto-immune, de préférence la sclérose en plaques, la composition comprenant au moins une cellule, notamment une cellule ne produisant pas naturellement des anticorps, sous une forme permettant leur

administration dans l'organisme d'un mammifère, humain ou animal, ainsi qu'éventuellement leur culture préalable, ladite cellule étant génétiquement modifiée *in vitro* par au moins une séquence d'acide nucléique contenant au moins un gène codant *in vivo* pour :

5 (i) au moins une protéine choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatiche de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par
10 exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID
15 N° 1 à 29 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et tout fragment

(ii) au moins un peptide défini à partir de la séquence primaire d'au moins une protéine choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24, et les
20 séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatiche de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et
25 les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29.

(iii) au moins toute molécule inhibitrice de la fonction et/ou de la fixation et/ou de l'expression de ces protéines.

30 (iv) au moins un peptide issu de la séquence primaire d'une protéine choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de

protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les
5 séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et capable de se fixer sur au moins une glycoprotéine du CMHI.

(v) au moins tout anticorps et toute partie d'anticorps capables de se
10 fixer à au moins une protéine choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID
15 N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29.

Plus particulièrement, ladite cellule cible provient soit du mammifère à
20 traiter, soit d'un autre mammifère que celui à traiter. Dans ce dernier cas, il convient de noter que ladite cellule cible aura subi un traitement la rendant compatible avec le mammifère à traiter. Par « mammifère » on entend, de préférence, un mammifère humain. Ces cellules sont établies en lignées cellulaires et sont préférentiellement CMHII⁻ ou CMHII⁺-inductibles comme les lymphocytes, les monocytes, les
25 astrocytes, les oligodendrocytes.

L'invention concerne également les cellules modifiées et un procédé de
préparation d'une cellule telle que décrite ci dessus caractérisé en ce que l'on introduit dans une cellule de mammifère ne produisant pas naturellement d'anticorps, par tout
moyen approprié, au moins une séquence d'acide nucléique contenant au moins un
30 gène d'intérêt thérapeutique et des éléments assurant l'expression dudit gène dans ladite cellule, ledit gène d'intérêt thérapeutique contenant une séquence d'acide nucléique codant pour une molécule ou un fragment de molécule *in vivo*, comme décrit

juste ci-dessus. Plus particulièrement, elle concerne des cellules procaryotes, des cellules de levure et des cellules animales, en particulier des cellules de mammifères transformées par au moins une séquence nucléotidique et/ou un vecteur tel que décrit précédemment.

5 Selon un mode de réalisation particulier, les cellules (cellules dendritiques, macrophages, astrocytes, lymphocytes T CD4+, lymphocytes T CD8+,) du patient ou allogéniques sont placées en contact d'une préparation purifiée du polypeptide cible, celui-ci étant internalisé, apprêté et présenté à la surface cellulaire associée aux molécules du CMHI et/ou CMHII et ainsi induire une réponse immune
10 spécifique contre le peptide. Les cellules « activées » sont ensuite administrées au patient chez lequel elles vont induire une réponse immune spécifique des antigènes (on utilise une voie naturelle de la réponse immune, mais on contrôle ce que la cellule présentatrice de l'antigène va présenter)

 Selon un mode de réalisation particulier, les cellules présentatrices
15 d'antigène (cellule dendritique, macrophage, astrocytes,...) sont modifiées *in vitro* pour exprimer les antigènes dans la cellule transformée qui vont s'associer aux molécules du CMHI et/ou CMHII et être présentées à la surface des cellules pour induire chez le patient chez lequel on administre la cellule modifiée une réaction immune parfaitement ciblée.

20 Toutes les approches vaccinales ne sont pas toujours satisfaisantes et conduisent par exemple à des réactions immunes limitées dirigées uniquement à l'encontre d'épitopes immunodominants ou contre des antigènes présentant une grande variabilité. De même la présentation incorrecte des antigènes par les glycoprotéines du système CMH à la surface des cellules, ne permet pas de développer chez le patient
25 traité une immunité anti-protéine d'intérêt convenable. Afin de pallier ces problèmes, certains auteurs ont proposé dans le cadre de tels procédés vaccinaux, de sélectionner les fragments minimaux antigéniques correspondant aux portions de peptide susceptibles d'être reconnus spécifiquement par les lymphocytes T cytotoxiques, de les exprimer dans les cellules afin qu'ils s'associent aux molécules du CMHI et soient
30 présentés à la surface des cellules pour induire chez le patient traité une réaction immunitaire parfaitement ciblée (Toes et al. 1997, PNAS 94 : 14660-14665). Plus particulièrement, il a été montré que des épitopes de très petites tailles (variant de 7 à

environ 13 acides aminés) qui sont exprimés à partir de minigènes introduits dans un virus de la vaccine, pouvaient induire une immunisation de type cellulaire. Il a par ailleurs été montré que plusieurs minigènes pouvaient être exprimés conjointement à partir d'un même vecteur (cette construction particulière est appelée « string of beads »). Une telle construction présente l'avantage d'induire une réaction immune de type CTL synergique (Whitton et al., 1993 J. of Virology 67 : 348-352).

Protocole de mise en contact des cellules et du fragment antigénique :

La présentation des fragments antigéniques par les molécules CMH repose sur un procédé intracellulaire identifié (voir Groettrup et al., 1996 Immunology Today 17 : 429-435 pour une revue) au cours duquel des peptides antigéniques de très courtes tailles (environ 7-13 acides aminés) sont produits par dégradation d'un polypeptide plus complexe contre lequel la réaction immune finale sera dirigée. Ces courts peptides sont ensuite associés aux molécules du CMH I ou du CMH II pour former un complexe protéique qui est transporté à la surface cellulaire afin de présenter lesdits peptides aux lymphocytes T cytotoxiques circulants ou aux lymphocytes T helper circulants, respectivement. Il convient en outre de noter que la spécificité des molécules CMH I ou CMH II vis-à-vis des peptides antigéniques varie en fonction des molécules CMH I ou CMH II (exemple pour le CMH I : HLA-A, HLA-B, ...) et de l'allèle (exemple pour le CMH I : HLA-A2, HLA-A3, HLA-A11) considérés. Au sein d'une même espèce animale, d'un individu à l'autre, il existe une grande variabilité des gènes codant pour les molécules du système CMH (à ce sujet, voir notamment George et al., 1995, Immunology Today 16 : 209-212).

Selon un mode de réalisation particulier, les cellules, telles que les cellules dendritiques, les macrophages, les astrocytes, les lymphocytes T CD4+, les lymphocytes T CD8+, sont modifiées de manière à exprimer à leur surface des anticorps spécifiques du peptide ciblé. Le peptide est neutralisé par les anticorps exprimés à la surface des cellules. Ces cellules sont de préférence immunes, de préférence du patient, de préférence cytotoxiques, modifiées pour exprimer tout ou partie d'un anticorps spécifique du polypeptide cible.

Isolement de cellules mononucléées à partir de sang périphérique :

En 1968, Boyum décrit une technique rapide qui permet par centrifugation du sang sur gradient de densité, de séparer les cellules mononucléées

(lymphocytes et monocytes) avec un bon rendement (rendement théorique 50 %, c'est-à-dire 10^6 cellules /ml de sang). 50 ml de sang périphérique prélevés stérilement dans des tubes héparinés sont centrifugés 20 minutes à 150g à 20°C. Les cellules récupérées sont diluées dans deux volumes de sang périphérique initial de PBS stérile. 10 ml de
5 cette suspension sont déposés sur 3ml d'une solution de Ficoll-Hypaque (milieu de séparation des lymphocytes, Flow). Après centrifugation pendant 20 minutes à 400g et 20°C sans freinage de décélération, les cellules mononucléées sédimentent à l'interface PBS-Ficoll, en une couche dense, opalescente, alors que la quasi-totalité des globules rouges et des polynucléaires sédimentent au fond du tube. Les cellules
10 mononucléées sont récupérées et lavées en PBS stérile.

Internalisation des antigènes par les cellules présentatrices de l'antigène :

Traitement préalable des cellules présentatrices de l'antigène : les cellules présentatrices de l'antigène sont préalablement lavées avec un tampon PBS-BSA à 0.5% (p/v) puis énumérées puis elle sont préincubées en présence de différents
15 inhibiteurs de réduction trois fois en PBS-BSA 0.5% contenant de 10 μ M à 10 mM final de DTNB (acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque) ou de NEM (N-éthylmaléimide). Les étapes ultérieures de fixation d'antigènes à la surface cellulaire ou d'internalisation d'antigènes se réalisent aussi en présence des différentes concentrations d'inhibiteurs.

20 Protocole d'internalisation des antigènes par les cellules présentatrices de l'antigène :

8.10^6 cellules sont internalisées en présence de quantité saturante de protéines radiomarquées à l'iode 125 (1 μ g) dans des micropuits dans 70 μ l. Après une heure d'incubation à 4°C sous agitation, les antigènes sont fixés à la surface des
25 cellules. La suspension cellulaire est lavée deux fois en PBS-BSA et les culots cellulaires sont repris dans 70 μ l de tampon et incubées à 37°C pendant différentes périodes allant jusqu'à 2 heures. Cellules et surnageants sont séparés par centrifugation à 800g pendant 5 minutes 4°C. Pour des plus longues périodes d'incubation, l'étape préliminaire de préfixation des antigènes à la surface des cellules est supprimée. Les
30 cellules sont diluées dans un milieu RPMI-10% SVF en présence de 20 mM Hépès, à 10^6 cellules /ml. Les cellules sont incubées en présence d'un excès d'antigène pendant

différentes périodes à 37°C (1 µg de molécules 5.10⁷ cellules monocytes macrophages ou 10⁷ cellules B-EBV).

Tous les agents thérapeutiques définis dans le cadre de la présente invention sont utilisés pour prévenir et ou traiter une maladie dégénérative et ou
5 neurologique et ou auto-immune, telle que la sclérose en plaques, seuls ou en combinaison. Ils peuvent être utilisés également pour évaluer leur efficacité *in vitro* ou *in vivo*.

Administration chez l'homme des agents thérapeutiques:

Le matériel biologique selon l'invention peut être administré *in vivo*
10 notamment sous forme injectable. On peut également envisager une injection par voie épidermique, intraveineuse, intra-artérielle, intramusculaire, intracérébrale par seringue ou tout autre moyen équivalent. Selon un autre mode de réalisation par administration orale ou tout autre moyen parfaitement connu de l'homme de l'art et applicable à la présente invention. L'administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée, une ou
15 plusieurs fois après un certain délai d'intervalle. La voie d'administration et le dosage les mieux appropriés varient en fonction de différents paramètres tels que par exemple l'individu ou la maladie à traiter, du stade et ou de l'évolution de la maladie, ou encore de l'acide nucléique et ou de la protéine et ou peptide et ou molécule et ou cellule à transférer ou de l'organe/tissus cible.

20 Pour la mise en œuvre du traitement du mammifère mentionné dans la présente invention, il est possible de disposer de compositions pharmaceutiques comprenant un matériel biologique tel que précédemment décrit, avantageusement associé avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour l'administration à l'homme ou à l'animal. L'utilisation de tels supports est décrite dans la littérature (voir
25 par exemple Remington's Pharmaceutical Sciences 16th ed. 1980, Mack Publishing Co). Ce véhicule pharmaceutiquement acceptable est préférentiellement isotonique, hypotonique ou présente une faible hypertonicité et a une force ionique relativement basse, tel que par exemple une solution de sucrose. Par ailleurs, ladite composition peut contenir des solvants, des véhicules aqueux ou partiellement aqueux tels que de l'eau
30 stérile, libre d'agents pyrogène et des milieux de dispersion par exemple. Le pH de ces compositions pharmaceutiques est convenablement ajusté et tamponné selon les techniques conventionnelles.

Figures :

La figure 1 représente la séquence en amino acides de la protéine GM2AP, et la localisation des peptides, qui est soulignée, et qui sont utilisés pour la production des anticorps anti-peptides GM2AP.

La figure 2 représente la séquence en amino acides de la protéine MRP14, et la localisation des peptides, qui est soulignée, et qui sont utilisés pour la production des anticorps anti-peptides MRP14.

La figure 3 représente la séquence en amino acides de la protéine Saposine B, et la localisation des peptides, qui est soulignée, et qui sont utilisés pour la production des anticorps anti-peptides Saposine B.

La figure 4 représente le dosage de la protéine MRP8 (ng/ml - en ordonnée) dans les urines de patients atteints de sclérose en plaques (SEP), dans les urines de patients atteints d'autres maladies neurologiques (AMN) et dans les urines de témoins considérés sains (TS). n signifie le nombre d'urines testées par catégorie.

La figure 5 représente le dosage de la protéine MRP14 (ng/ml - en ordonnée) dans les urines de patients atteints de sclérose en plaques (SEP), dans les urines de patients atteints d'autres maladies neurologiques (AMN) et dans les urines de témoins considérés sains (TS). n signifie le nombre d'urines testées par catégorie.

La figure 6 représente le dosage de la protéine MRP8/14 (ng/ml - en ordonnée) dans les urines de patients atteints de sclérose en plaques (SEP), dans les urines de patients atteints d'autres maladies neurologiques (AMN) et dans les urines de témoins considérés sains (TS). n signifie le nombre d'urines testées par catégorie.

La figure 7 représente les concentrations moyennes des protéines MRP8, MRP14, MRP8/14 (ng/ml - en ordonnée) dans les urines de patients atteints de sclérose en plaques (SEP), dans les urines de patients atteints d'autres maladies neurologiques (AMN) et dans les urines de témoins considérés sains (TS). n signifie le nombre d'urines testées par catégorie.

La figure 8 représente le dosage de la protéine GM2AP (ng/ml - en ordonnée) dans les urines de patients atteints de sclérose en plaques (SEP), dans les urines de patients atteints d'autres maladies neurologiques (AMN) et dans les urines de témoins considérés sains (TS). n signifie le nombre d'urines testées par catégorie. MS

signifie SEP. OND signifie AMN et Healthy signifie prélèvements de témoins supposés sains (TS).

La figure 9 représente le dosage de la protéine Saposine B ($\mu\text{g/ml}$ - en ordonnée) dans les urines de patients atteints de sclérose en plaques (SEP), dans les urines de patients atteints d'autres maladies neurologiques (AMN) et dans les urines de témoins considérés sains (TS). n signifie le nombre d'urines testées par catégorie. MS signifie SEP, OND signifie AMN et Healthy signifie prélèvements de témoins supposés sains (TS).

La figure 10 représente la co-détection des protéines Saposine B ($\mu\text{g/ml}$ - en ordonnée) et GM2AP (ng/ml - en abscisse) dans des échantillons d'urine de patients SEP, de témoins supposés sains et de patients atteints d'autres maladies neurologiques et la corrélation observée entre les taux des deux protéines.

La figure 11 représente : figure 11A, le dosage de la protéine GM2AP en ng/ml dans les urines d'un patient SEP en forme rémittente progressive (courbe claire) et la gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (courbe foncée) ; figure 11B le dosage de la protéine Saposine B en $\mu\text{g/ml}$ dans les urines d'un patient SEP en forme rémittente progressive (courbe claire) et la gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (courbe foncée).

La figure 12 représente le produit des concentrations des protéines GM2AP et saposine B en $\text{ng}\times\mu\text{g/ml}^2$ dans les urines d'un patient SEP en forme rémittente progressive (courbe claire) et la gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (courbe foncée).

La figure 13 : figure 13A, le dosage de la protéine GM2AP en ng/ml dans les urines d'un patient SEP en forme progressive (courbe claire) et la gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (courbe foncée) ; figure 13B le dosage de la protéine Saposine B en $\mu\text{g/ml}$ dans les urines d'un patient SEP en forme progressive (courbe claire) et la gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (courbe foncée).

La figure 14 représente le produit des concentrations des protéines GM2AP et saposine B en $\text{ng}\times\mu\text{g/ml}^2$ dans les urines d'un patient SEP en forme progressive (courbe claire) et la gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (courbe foncée).

La figure 15 représente la corrélation entre les concentrations de GM2AP en ng/ml (abscisse) et de gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (ordonnée) déterminées dans des urines de patients SEP et de témoins.

La figure 16 représente la corrélation entre les concentrations de Saposine B en $\mu\text{g/ml}$ (abscisse) et de gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (ordonnée) déterminées dans des urines de patients SEP et de témoins.

La figure 17 représente la corrélation entre le produit des concentrations de GM2AP et Saposine B en $\text{ng} \times \mu\text{g/ml}^2$ (abscisse) et de gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (ordonnée) déterminées dans des urines de patients SEP et de témoins.

La figure 18 représente la corrélation entre les concentrations en GM2AP (ng/ml - en ordonnée gauche), les concentrations en Saposine B ($\mu\text{g/ml}$ - ordonnée droite) et la gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (abscisse). Deux droites de corrélation estimées sont représentées sur le graphe. Les lignes en gras sont relatives aux concentrations en saposine B ; les lignes en noir clair sont relatives aux concentrations en GM2AP.

Exemples :

Exemple 1 : Recueil et pool d'urines.

Des échantillons d'urine de volumes différents ont été prélevés à partir d'individus sains (SEP négatifs) n'ayant a priori aucune maladie neurologique ou auto-immune. L'activité toxique de chaque prélèvement vis à vis de cellules astrocytaires murines a été testée *in vitro* en utilisant le test MTT. Au total un pool de 20 litres d'urine a été constitué (pool SEP négatif). Parallèlement, des échantillons d'urine de volumes différents ont été prélevés à partir d'individus atteints de sclérose en plaques (SEP positifs) à différents stade de la maladie. L'activité toxique de chaque prélèvement vis à vis de cellules astrocytaires murines a été testée *in vitro* en utilisant le test MTT. Au total un pool de 80 litres d'urine a été constitué (pool SEP positif).

Exemple 2 : Purification des protéines urinaires.

Les pools d'urine SEP positif et SEP négatif, recueillis et testés selon l'exemple 1, ont été purifiés pour obtenir une concentration en protéines élevée et éliminer au maximum les protéines de haut poids moléculaire.

Précipitation : des précipitations au sulfate d'ammonium (Prolabo - réf. 21 333 365) ont été effectuées sur les pools d'urine SEP positif et SEP négatif. Le pourcentage de 60 % de sulfate d'ammonium saturé pour 40 % d'urine, soit 390 grammes de sulfate d'ammonium par litre d'urine a été utilisé. Chaque pool est réparti en fractions de 1,8 litres dans des flacons de 2 litres pour améliorer la précipitation. La précipitation a été effectuée durant 2 x 8 heures, à température ambiante, sous agitation douce. Après centrifugation des pools d'urine à 3 000 tpm pendant 10 min., à une température de 10°C, le culot obtenu est repris dans un tampon Tris 20 mM contenant du CaCl₂ 1 mM et de l'urée à 0,25 M. Le mélange a ensuite été centrifugé à 3 000 tpm pendant 10 min. Le surnageant contient les protéines concentrées. Il est soit utilisé immédiatement pour l'étape suivante, soit congelé si l'étape suivante ne peut être effectuée en continu.

Chromatographie par échange d'ions : la solution contenant les protéines a ensuite été passée sur un gel DEAE fast Flow (commercialisé par PHARMACIA). Cette étape est effectuée à basse pression sur une colonne PHARMACIA remplie de gel. Les tampons sont amenés sur la colonne par une pompe péristaltique qui permet un débit régulier. Le tampon d'équilibration de la colonne est le tampon Tris 20 mM, pH 7. La fraction correspondant au surnageant de précipitation et contenant une quantité de sels trop élevée est dialysée contre ce tampon avant dépôt sur la colonne. Une élution par un gradient salin permet de récupérer les protéines. Le gradient d'élution est effectué par palier de NaCl 100, 200, 300, 500 mM dans le tampon d'équilibration de la colonne. Les fractions d'élution sont testées par le test MTT et ne seront conservées que les fractions positives, soit la fraction éluee à 200 Mm NaCl. Ces fractions pourront être traitées immédiatement ou conservées à l'état lyophilisé.

Purification : Une chromatographie d'exclusion stérique basée sur la différence de taille et de forme des protéines à éluer a été utilisée. La fraction correspondant à l'élution 200 mM NaCl est déposée sur la colonne. Au cours de l'élution, les protéines de faible masse moléculaire sont retenues et donc éluées plus tardivement que les grosses molécules. Les purifications ont été effectuées sur HPLC

avec une colonne TosoHaas TSK Prep G 3000 SW, d'un diamètre de 21.5 mm et d'une longueur de 300 mm, la limite d'exclusion en masse moléculaire est de 500 000 daltons. Le tampon d'élution utilisé contient du phosphate 100 mM, du sulfate de sodium 100 mM, à pH 6,8. La séparation du mélange de protéines a été effectué en 60 min. Seule la fraction correspondant à une masse de 15-20 000 daltons a été conservée. Cette fraction est dialysée dans un tampon Tris 20 mM contenant du CaCl₂ 0.2 mM, pH 7.2, puis lyophilisée.

A chaque étape, seules les fractions présentant une activité toxique significative ont été retenues pour l'étape suivante. Un contrôle de l'activité toxique des protéines a été effectué à chaque étape, à l'aide du test MTT. Seules les fractions présentant une activité toxique significative ont été retenues pour l'étape de purification supplémentaire décrite dans l'exemple 3.

Exemple 3 : Purification supplémentaire des protéines urinaires par chromatographie phase inverse.

Des pools d'urine provenant de patients SEP (pool SEP positif) et de patients non SEP (pool SEP négatif), obtenus après purification selon l'exemple 2, ont été repris dans de l'eau distillée, puis dilués avec une solution 0.2% TFA/10% acétonitrile pour obtenir une concentration finale d'environ 130 à 140 µg/ml.

La séparation par HPLC phase inverse C8 a été effectuée sur une colonne Brownlee Aquapore (nom commercial) commercialisée par la société Perkin Elmer (caractéristiques de la colonne : 300 angstroms/7 µm/(100x4,6) mm). Deux colonnes distinctes ont été utilisées respectivement pour les pools positif et négatif. Les injections ont été réalisées par multi-injections de 250 µl. Les protéines ont été éluées avec un gradient linéaire de 5% à 15% de tampon B en 5 min., puis de 15% à 100% de tampon B en 95 min., à un débit de 0.5 ml/min. Les tampons de séparation A et B utilisés sont respectivement le tampon 0.1% TFA (Pierce n° 28904)/ eau MilliQ et le tampon 0.09% TFA/80% acétonitrile (Baker). La détection a été effectuée par mesure de l'absorbance UV à 205 et 280 nm. La collecte des fractions a été effectuée en fractions de 1.5 ml et de 0.5-1 ml dans la zone d'intérêt. Les fractions ont été congelées après la collecte dans de la carboglace.

Les fractions collectées ont ensuite été séchées en speed vac et reprises dans 100 µl de 0,1% TFA 30% acétonitrile. 20µl des fractions ont été transférés dans des eppendorfs de 500 µl, séchés et lavés à deux reprises avec 100 µl d'eau MilliQ, puis séchés de nouveau.

5 L'activité toxique des protéines contenues dans chaque fraction recueillie après élution a été déterminée à l'aide du test MTT. Seule la fraction 21 présentant une activité toxique significative a été retenue. Le numéro de cette fraction correspond à l'ordre de l'élution en fonction des conditions d'élution énoncée dans cet exemple.

10 Exemple 4: Analyse des protéines obtenues par séparation sur HPLC sur gel SDS-TRICINE.

Le pool de collecte de la fraction 21 obtenue par HPLC, comme décrit dans l'exemple 3, et provenant de 20 injections du pool SEP positif, a été déposé sur un gel SDS-TRICINE 16% précoulé de 10 puits et de 1 mm d'épaisseur (commercialisé
15 par la société Novex). Les conditions d'utilisation du gel correspondent à celles préconisées par le fournisseur. L'échantillon est repris dans 75 µl du tampon d'échantillon 1 fois concentré (SDS-TRICINE N° LC 1676, 1 ml deux fois concentré + 50µl de β-mercaptoéthanol (Pierce) dilué au 1/2 dans de l'eau) et 25µl de l'échantillon sont déposés sur le gel en trois fois. Le pool de collecte de la fraction 21 provenant de 6
20 injections du pool SEP négatif a été déposé sur le gel dans les mêmes conditions que celles décrites pour le pool SEP positif. La migration sur les deux gels a été effectuée en parallèle dans la même cuve de migration (XCELL II NOVEX (nom commercial)) à un voltage constant de 125 mV pendant 2 heures. La cuve est placée dans un bac contenant de la glace. Les gels ont été colorés directement après la migration par
25 coloration au zinc imidazole (kit de coloration 161-0440 commercialisé par la société BIORAD) pour obtenir une coloration négative réversible. Les bandes de protéines sont translucides sur fond opaque.

Exemple 5 : Digestion à la trypsine des bandes de gel.

30 Toutes les bandes de protéines visualisées dans les dépôts de la fraction 21 ont été découpées et soumises à une protéolyse par la trypsine.

Les bandes de gels sont découpées au scalpel en tranches de 1 mm et transférées dans des tubes eppendorfs. Les eppendorfs sont soumis à un pic de centrifugation pour faire tomber les morceaux de gel et après centrifugation 100 µl de tampon de lavage (100 mM NH_4CO_3 /50% CH_3CN) sont ajoutés aux morceaux de gel.

5 Après 30 min. d'agitation à température ambiante, le surnageant est enlevé par fractions de 20 µl et l'étape de lavage est renouvelée deux fois. Les eppendorfs sont séchés pendant 5 min. en speed vac. 20 µg de trypsine (Modified sequenal grade PROMEGA V5111) sont repris dans 200 µl de tampon de digestion (5 mM TRIS, pH 8) et sont dissous pendant 30 min. à température ambiante, sous agitation intermittente

10 et 20 à 30 µl de trypsine resuspendue sont ajoutés aux morceaux de gel. Les eppendorfs sont centrifugés et conservés en chambre chaude à 28°C pendant une nuit. Après digestion les bandes de gel peuvent être utilisées immédiatement pour les mesures de masse ou congelées pour usage ultérieur.

15 Exemple 6 : Digestion chimique au CNBR des bandes de gel.

Dans l'éventualité d'une protéine résistante aux clivages enzymatiques, en particulier à l'action de la trypsine comme décrit dans l'exemple 5, les bandes entre 16kD et 20kD ont été traitées avec du CNBR. Les bandes de gel, déjà utilisées pour les digestions avec la trypsine, sont séchées 5 à 10 min. en speed vac.

20 Une solution de CNBR (FLUKA) à 200 mg/ml a été préparée dans 70 % acide formique (BAKER). 20 µl de cette solution ont été utilisées pour réhydrater les morceaux de gel. La réaction s'est faite pendant 20 h à température ambiante et à l'obscurité. Les peptides sont extraits 3 fois 30 min. avec 100 µl de 0.1 % TFA / 60% Acétonitrile. Les solutions d'extraction sont réunies et concentrées à 20 µl. Ces

25 échantillons sont dilués 5 fois dans 0,1 % TFA/eau. Les conditions de séparation sont celles décrites pour les peptides de la digestion avec la trypsine.

Exemple 7 : Analyse par spectrométrie MALDI-TOF.

30 µl de tampon d'extraction (2 % TFA/50 % acétonitrile) sont ajoutés

30 aux échantillons. Les eppendorfs à analyser sont soumis à une centrifugation de 5 min., puis à une sonication de 5 min. et finalement à une centrifugation de 1 min.

Sur un disque en acier inoxydable, 14 dépôts de 0.5 µl de matrice (acide α-cyano-4-hydroxy-trans-cinnamique à saturation dans de l'acétone) sont réalisés. Une fine couche microcristalline uniforme est obtenue. 0.5 µl d'une solution de 2 % TFA/eau sont déposés sur cette sous-couche sur les 14 dépôts, puis 0.5 µl d'échantillon à analyser sont ajoutés. Dans cette goutte ainsi formée, 0.5 µl d'une solution à saturation d'acide α-cyano-4-hydroxy-trans-cinnamique dans 50 % acétonitrile eau sont ajoutés. Après un séchage à température ambiante pendant 30 min., les dépôts cristallins sont lavés avec 2 µl d'eau qui sont immédiatement évacués par un souffle d'air. Tous les spectres sont obtenus sur un spectromètre de masse BRUKER BIFLEX (marque de commerce) équipé d'un réflectron. Les mesures (90 à 120 tirs laser sur l'ensemble du dépôt) sont accumulées pour obtenir un spectre de masse qui soit le plus représentatif de l'ensemble des peptides présents dans le sandwich matrice-échantillon. Pour chaque dépôt, une calibration avec les peptides de l'autolyse de la trypsine a été faite afin de pouvoir utiliser une précision de mesure inférieure à 100 ppm.

Les recherches dans les banques de données ont été exécutées dans MS-FIT PROTEINPROSPECTOR (<http://prospector.ucsf.edu>). Les paramètres communs, utilisés dans ces recherches, sont (1) base de données : NCBIInr, (2) une tolérance de 100-50 ppm, (3) les cystéines ne sont pas modifiées, (4) les méthionines peuvent être oxydées, (5) gamme de poids moléculaire : 1000-100000 Da, (6) jusqu'à 3 sites de coupure peuvent être ignorés.

Exemple 8 : Séquençage N-terminal des peptides de digestion.

(i) Extraction et séparation par HPLC des peptides de digestion.

Après les mesures de masse sur la totalité de la digestion, le reste des peptides est extrait en 3 fois 30 min. dans un bain de sonication avec 0.1 % TFA-60 % acétonitrile. Les solutions d'extraction sont réunies et séchées jusqu'à 20 µl en speed vac. Après dilution dans 80 µl de tampon A (0.1 % TFA eau), les extractions des bandes de gel, digérées avec de la trypsine, sont injectées sur une colonne C18 MZ-Vydac (125x1.6mm 5 µm). L'élution des peptides se fait à un débit de 150 µl min. et dans un gradient allant de 5 % de tampon B (0.09 % TFA 80 % acétonitrile) à 40 % de tampon B en 40 min., puis de 40 % de tampon B à 100 % de tampon B en 10 min. La

détection est faite par mesure de l'absorbance UV à 205 nm. La collecte des pics est effectuée dans des tubes eppendorf de 500 µl. Les fractions sont conservées sur la glace et pour la bande de 18-20 kD du pool 21 SEP positif analysées par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

5 (ii) Séquençage N-terminal.

Les fractions ne correspondant qu'à un seul pic de masse ont été analysées par dégradation d'Edman sur un séquenceur (Modèle 477A PERKIN ELMER/Applied Biosystems). Les conditions de séquençage sont celles décrites par le constructeur. Une micro cartouche a été utilisée pour le dépôt des échantillons et les PTH-AminoAcid
10 sont identifiés avec un système HPLC online (Modèle 120A PERKIN ELMER/Applied Biosystems).

Le dépôt de la fraction à séquencer s'est fait en plusieurs dépôts de 15 µl avec des séchages intermédiaires. Le tube ayant contenu le peptide est lavé avec 15 µl d'acide formique 85 % (BAKER). Les séquences d'acides aminés correspondent
15 toujours aux masses mesurées. Les peptides, dont les masses ne correspondent pas à la protéine principale identifiée, ont été séquencés en priorité. De cette manière, il a été possible d'identifier jusqu'à trois protéines dans une bande de gel.

Exemple 9 : Résultats et discussion.

20 Après HPLC inverse du pool témoin SEP négatif et du pool SEP positif, l'activité toxique de chaque fraction d'élution a été déterminée en utilisant le test MTT. Seule la fraction 21 du pool SEP positif présente une activité toxique *in vitro*. La fraction 21 du pool témoin SEP négatif ne présente aucune activité toxique. L'activité toxique de la fraction 21 du pool SEP positif a été confirmée *in vitro* par FACS, comme
25 décrit dans la demande de brevet WO 98/11439 sur des cellules astrocytaires murines.

Le contenu protéique de la fraction 21 du pool témoin SEP négatif et du pool SEP positif a été observé après séparation sur gel SDS-TRICINE 16% et coloration du gel au zinc/imidazole. Des protéines de poids moléculaires apparents élevés ont été trouvées dans les deux fractions. Par contre cinq bandes différentes et de
30 poids moléculaires apparents faibles ne sont visibles que dans la fraction 21 du pool SEP positif (bandes 8, 14, 18 et 20 kD). A chaque bande correspond au moins une protéine et des variants desdites protéines qui ont un poids moléculaire apparent proche

de celui de la protéine native. Ces séquences variantes présentent un pourcentage d'homologie ou d'identité avec les séquences natives d'au moins 70%, de préférence d'au moins 80% et avantageusement d'au moins 98 %.

Les protéines d'intérêt de la fraction 21 du pool SEP positif ont ensuite été analysées par spectrométrie de masse et/ou séquençage et recherche d'homologie dans les banques de données. Les résultats montrent la présence de cinq bandes de protéines migrant entre 22 et 5 kD dans la fraction 21 du pool SEP positif et des variants desdites protéines.

Ces protéines sont le fragment C-terminal du Perlecan, qui commence à l'acide aminé 3464 et se termine à l'acide aminé 3707 de la séquence protéique complète, identifiée dans l'identificateur de séquences SEQ ID N° 2, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol dont la séquence est donnée en SEQ ID N° 4, le précurseur de l'activateur du ganglioside GM2 identifié en SEQ ID N° 8, la calgranuline B identifiée en SEQ ID N° 17 et la saposine B représentée en SEQ ID N° 24. Comme décrit ci dessus des homologues ou variants desdites protéines ont également été identifiés par séquençage. Ces séquences protéiques homologues ou variantes sont le produit de mutations au niveau des gènes codant pour lesdites protéines. A titre d'exemple, la SEQ ID N° 9 présente 99 % d'homologie ou d'identité avec la SEQ ID N° 8 du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2 et le fragment de SEQ ID N° 9 qui commence à l'acide aminé 34 et se termine à l'acide aminé 202 présente 98,88 % d'homologie ou d'identité avec le fragment correspondant de la protéine native identifiée en SEQ ID N° 8.

Exemple 10 : Mise en évidence des protéines dans un échantillon urinaire.

Des échantillons d'urine provenant d'un individu SEP négatif et d'un patient SEP positif ont été prélevés. Ces échantillons d'urine ont été purifiés selon le protocole décrit précédemment. Les fractions d'élution finales 21 ont été analysées séparément par spectrométrie de masse. Le profil de masse de chaque fraction correspondant à chaque échantillon d'urine a été comparé au profil de masse obtenu pour les protéines identifiées dans les exemples précédents. Les résultats montrent que pour l'échantillon d'urine provenant du patient SEP positif les masses correspondent aux molécules (i) fragment C-terminal du Perlecan, (ii) précurseur de la protéine

activatrice du ganglioside GM2, (iii) calgranuline B et (iv) saposine B identifiées précédemment. Par contre aucune de ces masses n'a été identifiée dans le profil de masse obtenu après analyse de l'échantillon d'urine provenant de l'individu SEP négatif. Le procédé décrit est utilisable comme essai de diagnostic.

5

Exemple 11 : Essai en Western Blot.

Des Western Blot ont été réalisés sur différentes fractions d'urine brute ou purifiée comme décrit dans l'exemple 2. Des échantillons d'urine provenant d'individus sains et de patients atteints de sclérose en plaques sont testés en parallèle.

10 Les échantillons sont déposés sur un gel d'électrophorèse permettant de séparer les différentes protéines en fonction de leur masse moléculaire sous l'action d'un champ électrique. Les Western Blot sont réalisés après transfert des protéines du gel sur une membrane. Pour révéler les protéines transférées, la membrane est saturée en tampon de saturation, puis incubée avec un anticorps directement marqué à la phosphatase

15 alcaline. L'anticorps utilisé est un anticorps anti-calgranuline (anticorps monoclonal de souris, clone CF 145 sous-type IgG 2b commercialisé par la société Valbiotech : référence MAS 696p lot PC96G696). Le substrat de l'enzyme est le dichlorure de 3,3'-(1,1'-biphényl)4,4'diazonium et 2-naphtalényl phosphate de sodium (commercialisé sous la dénomination β Naphtyl acid phosphate Sigma réf. N7375 et δ dianisine

20 Tetrazotized D3502) est ajouté pour la révélation des bandes et la visualisation des protéines liées à l'anticorps. Une molécule de masse moléculaire apparente d'environ 14 000 est révélée dans les urines purifiées de patients atteints de SEP, avec un signal relativement intense. Cette protéine correspond à la calgranuline B (masse moléculaire apparente : 14 kD). Par contre, aucun signal n'est observé à partir d'urine d'individus

25 sains. Cette observation confirme la présence de cette protéine spécifiquement dans les urines de patients atteints de SEP et la mise en œuvre d'un procédé de détection utilisant un anticorps reconnaissant la protéine.

Exemple 12 : Production d'anticorps monoclonaux.

30 La production d'anticorps monoclonaux par ascite impose une compatibilité du système H-2 entre l'hybridome et la souris productrice. 20 souris femelles Balb/c, âgées de 6 semaines, subissent une injection de 0.5ml de Pristane (2-6-

10-14 acide tétraméthylpentadecane) dans leur cavité péritonéale, pour la production d'ascite (Porter et al., 1972). Une semaine à 10 jours plus tard, 5.10^7 à 10.10^8 hybridomes dilués dans 0.5ml de tampon stérile NaCl 0.145M, Na_2HPO_4 10 mM, KCl 2.7 mM, KH_2PO_4 1.5 mM à pH 7.4, sont injectés par voie intrapéritonéale. L'ascite apparaît une à deux semaines plus tard. Les liquides d'ascites présents dans la cavité péritonéale sont alors recueillis avec une seringue après incision du péritoine. Le liquide recueilli est centrifugé à 3000g pendant 15 minutes à température ambiante, filtré sur gaze pour éliminer le gras, puis tamponné en ajoutant 1/20^{ème} de son volume de tris-HCl 1M à pH 8.0. Cette méthode permet d'obtenir des quantités d'anticorps 10 fois supérieures à celles obtenues par culture d'hybridomes.

Les immunoglobulines présentes dans le liquide d'ascite sont relarguées par les sels (sulfate d'ammonium ou sulfate de sodium). Le liquide d'ascite est précipité par le sulfate d'ammonium 40%. Après 20 minutes au froid la solution est centrifugée 15 minutes 8000g à 4°C. Le précipité est lavé et resuspendu à froid dans une solution de sulfate d'ammonium 40% puis de nouveau centrifugé. Le nouveau précipité enrichi en IgG est remis en solution dans du tampon PBS et dialysé la nuit contre le tampon Tris-HCl 25 mM, NaCl 150 mM pH 7.4. Parallèlement une colonne d'agarose-Protéine A (ou protéine G) (commercialisée sous forme lyophilisée, Pierce) est lavée extensivement avec le tampon Tris-HCl 25 mM, NaCl 150mM pH7.4. La solution enrichie en IgG est déposée sur la colonne puis la colonne est lavée. Les IgG retenues par la colonne sont éluées à pH acide (glycine 200 mM pH 2.8). Les fractions éluées sont neutralisées avec un volume de Tris-Base 1M pH 10.5. Le contenu en immunoglobulines de chaque fraction recueillie est quantifiée par lecture d'absorbance à 280 nm (ϵ 1%, 1cm = 14.0 Prahl et Porter 1968). Les fractions riches sont poolées. Le degré de purification des IgGs poolées est analysé par électrophorèse en gel d'acrylamide en présence de SDS. Les IgGs purifiées sont dialysées une nuit contre le tampon Tris-HCl 25 mM, NaCl 150mM pH7.4, filtrées stérilement, aliquotées et conservées à -20°C. leur concentration finale est déterminée par lecture de l'absorbance à 280 nm ou par dosage micro-BCA. Les peptides immunogènes référencés SEQ ID N° 58, SEQ ID N° 54, SEQ ID N° 55, SEQ ID N° 56, SEQ ID N° 57, SEQ ID N° 58, SEQ ID N° 59 et SEQ ID N° 65 ont été utilisés pour la production d'anticorps monoclonaux, selon le protocole décrit ci dessus. Mais, il est à la portée de l'homme du

métier de définir d'autres protocoles pour la production d'anticorps monoclonaux, par exemple à partir des techniques décrites par Köhler et Milstein et par Galfre G. *et al.* précédemment cités ou des techniques dérivées de celles ci.

5 Production de protéines recombinantes et d'anticorps polyclonaux et monoclonaux.

Protéines recombinantes :

Les protéines recombinantes GM2AP (SEQ ID NO :73) et Saposine B (SEQ ID NO :74) utilisées pour réaliser la gamme étalon de cette étude ont été produites en système procaryote et purifiées à partir des clones de ces deux protéines
10 obtenus dans notre laboratoire en utilisant les méthodes et protocoles bien connus de l'homme de l'art.

Anticorps anti-GM2AP ou anti-Saposine B :

Les anticorps anti-GM2AP ou anti-Saposine B utilisés pour réaliser l'étude ont été soit produits dans notre laboratoire ou donnés généreusement.
15 Des anticorps polyclonaux anti-Saposine B et anti-GM2AP (Li et al. Glycoconjugate, 1984) ont été utilisés pour l'étude (cf les exemples ci-dessous) : ils sont dénommés SAP84 et GM2AP84.

Des anticorps polyclonaux anti-GM2AP ou anti-Saposine B ont été produits et purifiés dans le laboratoire en utilisant les protocoles et méthodes bien
20 connus de l'homme de l'art : 50 µg de protéine GM2AP ou Saposine B procaryote achetée ont été injectés à des lapins aux jours J0, J28 et J56 ; deux injections de rappel ont été réalisées une fois par mois pendant deux mois consécutifs. Les deux anticorps polyclonaux anti-GM2AP et deux anticorps polyclonaux anti-Saposine B ont ainsi été obtenus et leur spécificité vis-à-vis de la protéine recombinante a été vérifiée par
25 Western blot et par Elisa.

Des anticorps polyclonaux anti-peptides GM2AP ou Saposine B ont été produits et purifiés dans le laboratoire en utilisant les protocoles et méthodes bien connus de l'homme de l'art : 75 µg de peptides GM2AP ou Saposine B définis, produits et couplés à KLH dans notre laboratoire ont été injectés aux jours J0, J28 et
30 J56 ; plusieurs boosts ont été réalisés une fois par mois pendant 5 mois consécutifs avec injection de 75 µg à chaque fois. Quatre anticorps polyclonaux anti-peptides GM2AP, quatre anticorps polyclonaux anti-peptides Saposine B et quatre anticorps

polyclonaux de lapins anti-peptides MRP14 ont ainsi été obtenus et leur spécificité vis-à-vis de la protéine recombinante a été vérifiée par Western blot et par Elisa. La séquence des peptides GM2AP, Saposine B et MRP14 choisis sont décrites dans les figures de 1 à 3.

5 Il a été obtenu :

- un anticorps anti-mélange de deux peptides de 13 et 15 acides aminés de GM2AP : 189-190 ; un anticorps anti-peptide de 18 acides aminés de GM2AP : 191-192 (cf. Figure 1),

- un anticorps anti-mélange de deux peptides de 13 et 19 acides aminés de MRP14 : 193 ; un anticorps anti-peptide de 17 acides aminés de MRP14 : 195-196 (cf. Figure 2),

- un anticorps anti-mélange de trois peptides de 12, 15 et 15 acides aminés de Saposine B : 74-75 ; un autre anticorps anti-mélange de 3 peptides de 12, 15 et 15 acides aminés de Saposine B : 72-73 (cf. Figure 3).

15 Des anticorps monoclonaux anti-fraction native ont été produits et purifiés dans le laboratoire en utilisant les protocoles et méthodes bien connus de l'homme de l'art. La « fraction native » correspond à la fraction d'élution cytotoxique obtenue à partir du pool des 80 litres d'urine de patients SEP et après purification. C'est la dernière fraction d'élution qui contient les trois protéines GM2AP, Saposine B, MRP14. 30 µg de cette fraction de purification ont été injectés à trois souris aux jours J0, J14, J28 et le prélèvement a été effectué à J38. Après « screening » et fusion cellulaire, protocoles connus de l'homme de l'art pour l'établissement d'hybridomes et d'anticorps monoclonaux, les hybridomes ont été ré-injectés à la souris et le liquide d'ascite a été récupéré 10 jours après. Les anticorps ont été purifiés sur colonne 20 sépharose-Protéine A et la spécificité vis-à-vis de la fraction utilisée pour l'immunisation a été vérifiée par Western blot et par Elisa. Ainsi quatre anticorps monoclonaux ont été obtenus : 19C1A7, 3D3F9, 18C8C5 et 7D12A8.

Exemple 13 : Dosage des protéines MRP14 dans les urines par technique
30 ELISA.

Les protéines MRP14, MRP8 et l'hétérocomplexe MRP8/14 ont été dosés dans des urines humaines en utilisant (i) soit une technique de dosage Elisa selon le

procédé connu de l'homme de l'art et en utilisant les anticorps anti-MRP décrits dans les exemples précédents ; (ii) soit le kit 'MRP Enzyme Immunoassay' commercialisé par BMA Biomedicals AG, Augst, Switzerland, en utilisant les anticorps du kit, le protocole étant réalisé suivant la notice du kit..

5 Détection de MRP14 et MRP8/14 dans des urines.

Les dosages a été réalisés à partir de 17 urines d'individus issus de la population active (TS), de 27 urines de patients atteints de sclérose en plaques (SEP et de 7 urines de patients atteints d'autres maladies neurologiques (AMN).

- La figure 4 illustre les taux de MRP8 dosés dans ces urines : alors que la
10 concentration en MRP8 est quasiment nulle dans les urines AMN, il n'y a pas vraiment de différence de distribution entre les urines TS et SEP. Notons cependant que les différences observées sont quasiment négligeables car les concentrations dosées sont extrêmement faibles.

- La figure 5 illustre les taux de MRP14 dosés dans les mêmes urines :
15 alors qu'il n'y a pas vraiment de différences de distribution des concentrations entre les urines TS et AMN, les concentrations sont plus élevées dans certaines urines SEP.

- La figure 6 illustre les taux d'hétérodimère MRP8/14 dosés dans les mêmes urines : alors qu'il n'y a pas vraiment de différence entre les concentrations des urines TS et AMN, on observe des plus fortes concentrations dans certaines urines
20 SEP, correspondant peut-être à une sous population de patients SEP caractérisée par une activité de la maladie. MRRP8/14 dosé dans les urines est un marqueur de l'activité de la maladie SEP caractérisée par un pic d'inflammation).

- La figure 7 récapitulative confirme qu'il n'y a pas de différence significative de concentration en MRP8 et en MRP14 entre les urines TS, AMN et
25 SEP, alors qu'une faible différence de concentration en MRP8/14 est observée entre ces urines, cette concentration étant plus élevée en moyenne dans les urines SEP et étant un marqueur de l'activité de la maladie (pic d'inflammation).

Exemple 14 : Protocoles ELISA utilisés pour le dosage des protéines
30 GM2AP et Saposine B.

Les protéines GM2AP ou Saposine B ont été dosées dans des urines humaines en utilisant des anticorps polyclonaux anti-GM2AP ou anti-Saposine B ? en

suivant le protocole Elisa décrit par Gardas et al. (Glycoconjugate Journal 1, 37-42, 1984). Les principales étapes sont brièvement décrites ci-dessous :

A chaque étape, les puits d'une microplaque de 96 puits sont remplis avec 200 µl de la solution désignée. Les puits sont d'abord « coatés » avec une solution de GM2AP (protéine recombinante procaryote) diluée à 50 ng/ml dans un tampon carbonate-bicarbonate, pH 9.6. Après incubation une nuit à 4°C, la solution est éliminée et les puits sont lavés quatre fois avec du tampon PBS pH 7,4 contenant du Tween-20 0.05% (PBS-Tween). Les microplaques ainsi coatées sont stockées à 4°C pendant environ 2 semaines.

Les échantillons d'urine à trois dilutions différentes (20x, 40x et 80x ou d'autres dilutions appropriées) sont incubés avec une dilution appropriée de l'anticorps polyclonal de lapin anti-GM2AP ou anti-Saposine B pendant une nuit à 4°C. Une série de dilutions standard d'une protéine recombinante allant de 2.0 à 62.5 ng/ml est utilisée pour réaliser la gamme étalon et sont traitée de la même façon. Toutes les dilutions sont faites en tampon PBS-Tween contenant 1 mg/ml d'ovalbumine. Ainsi, 0,2 ml de chaque solution incubée est ajoutée dans des puits « coatés » en duplicat et les plaques sont laissées pendant 2 heures à température ambiante. Les puits sont alors lavés quatre fois en PBS-Tween et remplis encore avec une solution d'anticorps de chèvre anti-IgG de lapin couplés à la peroxidase et diluée environ 1200 fois. Après une incubation de 2 heures à température ambiante, les puits sont lavés quatre fois en PBS-Tween et remplis e nouveau avec le réactif de coloration. Le réactif de coloration consiste en 100 mg d'acide 2,2'-azino-di-(3-éthylbenzothiazoline) sulfonique et 10µl de 30% de peroxide d'hydrogène pendant une heure à température ambiante et le degré de coloration de chaque micropuits est estimé par lecture d'absorbance à 405 nm.

Une courbe standard est construite en mettant en abscisse la concentration de GM2AP de la gamme étalon ou de Saposine B avec une échelle logarithmique et en ordonné le pourcentage d'absorbance avec une échelle linéaire. Le pourcentage d'absorbance de l'échantillon est le rapport d'absorbance entre l'échantillon d'urine et le contrôle qui contient seulement l'antisérum, sans l'antigène soluble.

Une solution de protéine recombinante GM2AP produite en système procaryote, et de concentration 3 mg/ml est diluée en tampon carbonate 50 mM, pH 9.6 et 50µl sont ajoutés dans chaque puits d'une microplaque à 96 puits, soit 50µl par puits

d'une solution à 0,5 µg/ml. Les plaques ainsi préparées sont incubées une nuit à température ambiante. L'anticorps polyclonal anti-GM2AP produit dans le laboratoire (lapin 79) a été purifié et dilué en tampon PBS-Tween 0.05% en présence de sérum de cheval 10%. Cette solution est diluée au 1/8000^{ème}. La solution est utilisée pour réaliser
5 une gamme étalon avec 8 points de gamme couvrant les concentrations de 0 à 500 ng/ml. Une préincubation est réalisée pendant une nuit à température ambiante entre 100 µl d'anticorps et 100 µl d'échantillon d'urine à doser ou de solution protéine recombinante GM2AP ou Saposine B servant pour la gamme étalon. Après lavage de la microplaque en PBS-Tween, 50µl du mélange d'incubation sont ajoutés par puits, puis
10 incubés pendant deux heures à température ambiante. La microplaque est de nouveau lavée en PBS-Tween, puis 50 µl d'anticorps anti-IgG de lapin couplé à la peroxidase et dilués au 1/5000 sont ajoutés dans chaque micropuits de la plaque et incubés pendant deux heures à température ambiante. Après de nouveaux lavages de la microplaque, 100µl d'OPD sont ajoutés dans chaque puits et incubés pendant 20 minutes à
15 température ambiante. La coloration de chaque puits, proportionnelle à la concentration de GM2AP ou de Saposine B reconnue par l'anticorps spécifique utilisé, est estimée par lecture d'absorbance.

Une solution de protéine recombinante GM2AP ou Saposine B produite
20 en système procaryote, et de concentration 3 mg/ml est diluée en tampon carbonate 50 mM, pH 9,6 et 50µl sont ajoutés dans chaque puits d'une microplaque à 96 puits, soit 50µl par puits d'une solution à 1,5 µg /ml. Les plaques ainsi préparées sont incubées une nuit à température ambiante. Les anticorps polyclonaux anti-peptides GM2AP produits dans le laboratoire (lapin 190 et lapin 191) purifiés sont utilisés seuls ou en
25 mélange dilués au 1/1000 pour chacun en tampon PBS-Tween 0,05% en présence de sérum de cheval 10%. La gamme étalon est réalisée en utilisant de la protéine recombinante procaryote GM2AP ou Saposine B diluée de façon à couvrir la gamme de concentration 0 à 1500 ng/ml avec 8 points. 100 µl d'anticorps (un anticorps ou les deux ensemble) sont pré-incubés en présence de 100µl d'échantillon d'urine à tester ou
30 de solution GM2AP ou Saposine B recombinante, pendant une nuit à température ambiante. Après lavage de la microplaque en PBS-Tween, 50µl du mélange d'incubation est ajouté par puits puis incubés pendant deux heures à température

ambiante. La microplaque est de nouveau lavée en PBS-Tween, puis 50 µl d'anticorps anti-IgG de lapin couplé à la peroxidase, dilués au 1 5000, sont ajoutés dans chaque micropuits de la plaque et incubés pendant deux heures à température ambiante. Après lavage de la microplaque, 100µl d'OPD sont ajoutés dans chaque puits et incubés
5 pendant 20 minutes à température ambiante. La coloration de chaque puits, proportionnelle à la concentration de GM2AP ou Saposine B reconnue par l'anticorps spécifique utilisé, est estimée par lecture d'absorbance.

Exemple 15 : Dosage des protéines GM2AP dans les urines.

10 La protéine GM2AP a été dosée dans les urines de 22 patients atteints de sclérose en plaques (SEP), 5 patients atteints d'autres maladies neurologiques (OND) et 9 individus choisis parmi la population active et recueillies pendant une visite médicale (Healthy), en suivant le protocole Elisa décrit ci-dessous, utilisant des anticorps polyclonaux anti-GM2AP. Les patients SEP sélectionnés pour cette étude sont des
15 patients tout azimut, c'est-à-dire avec différents stades et profils de la maladies, et différents traitements, etc...

Les résultats du dosage sont rapportés dans la figure 8. Alors que seulement 0/5 urines OND et 2/9 urines dites 'Healthy' présentent une concentration en GM2AP supérieure à 200 ng/ml, 10/22 (soit 45%) présentent une concentration
20 supérieure à 200 ng/ml.

Ces résultats indiquent que si la protéine GM2AP est présente en très faible concentration (<400 ng/ml) dans les urines d'individus de la population active, elle est présente en plus forte concentration dans les urines de patients SEP. Cependant 12 urines SEP présentent également des taux faibles de GM2AP. Parmi ces 12 patients,
25 10 sont en traitement. Les fortes concentrations urinaires de GM2AP semblent être un marqueur de la pathologie SEP, et plus précisément un marqueur d'un stade ou d'une forme de la maladie, de l'activité de la maladie, et est certainement influencé par tout traitement en cours. Notons que deux individus de la population active ont des concentrations élevées de GM2AP (ces deux cas ont été inclus volontairement dans
30 l'étude, car ils présentaient tous deux une activité gliotoxique dans leur urines contrairement aux autres individus de cette même catégories). Il est impossible de savoir s'il s'agit d'individus sains, ou atteints d'une pathologie, ou des individus

atteints d'une sclérose en plaques car les échantillons des individus dits « Healthy » ont été prélevés de manière anonyme, sans connaissance du dossier clinique.

Des concentrations urinaires plus élevées de GM2AP sont détectées dans les urines de patients SEP ; une concentration élevée de GM2AP peut être alors un
5 marqueur de la pathologie SEP, et plus précisément d'une forme de la maladie, d'un stade de la maladie, d'une période d'activité, et peut être influencée par tout traitement en cours. Ces concentrations urinaires élevées en GM2AP peut également avoir une valeur prédictive d'un début d'aggravation de la maladie, ou d'une SEP benigne en début d'évolution, etc

10 Les valeurs absolues des concentrations GM2AP détectées dans les urines sont dépendantes de l'affinité et de la spécificité de l'anticorps utilisé, mais d'une façon générale, la tendance entre les trois groupes d'individus est conservée quelque soit l'anticorps utilisé.

15 Exemple 16 : Dosage des protéines Saposine B dans les urines.

La protéine Saposine B a été détectée dans les même échantillons d'urines que ceux utilisés pour l'étude de la détection de GM2AP. Les dosages ont été réalisés en parallèle avec ceux du GM2AP, dans une même étude, en suivant le protocole Elisa décrit ci-dessous, utilisant des anticorps polyclonaux anti-Saposine B.

20 Les résultats du dosage Saposine B sont reportés dans la Figure 9. 0/5 urines OND et 2/9 urines Healthy présentent une concentration en Saposine B supérieure à 2 µg/ml, alors que 6/22 (soit 27%) présentent une concentration supérieure à 2 µg /ml.

Ces résultats indiquent que la protéine Saposine B est présente dans
25 chaque urine (population dite saine ou population dite malade) à des concentrations non négligeables, c'est-à-dire < 2µg /ml. Ces résultats de dosage sont compatibles avec ceux décrits dans la bibliographie. Cependant même si la Saposine B est présente dans chaque urine, elle semble être présente en plus forte concentration dans certaines urines SEP. Cette augmentation de concentration de saposine B dans les urines Sep est peut-
30 être masquée par la concentration basale de cette protéine à l'état ordinaire. Ainsi les fortes concentrations urinaires de Saposine B semblent être un marqueur de la pathologie SEP, et plus précisément un marqueur d'un stade ou d'une forme de la

maladie, de l'activité de la maladie, et est certainement influencée par tout traitement en cours. La Saposine B dosée seule semble être cependant un marqueur un peu moins discriminant d'une forme ou d'une activité de la maladie que le GM2AP. Notons encore un fois que deux individus de la population active ont des concentrations élevées de Saposine B et que ce sont les deux même individus qui présentaient aussi une forte concentration en GM2AP dans leurs urines.

En conclusion, des concentrations urinaires plus élevées de Saposine B sont détectées dans les urines de patients SEP : une concentration élevée de Saposine B peut être alors un marqueur de la pathologie SEP, et plus précisément d'une forme de la maladie, d'un stade de la maladie, d'une période d'activité, et peut être influencée par tout traitement en cours. Ces concentrations urinaires élevées en GM2AP peut également avoir une valeur prédictive d'un début d'aggravation de la maladie, ou d'une SEP benigne en début d'évolution, etc Mais d'une façon générale, les fortes concentrations de Saposine B seules semblent être des marqueurs moins discriminants que les fortes concentrations de GM2AP seules.

Les valeurs absolues des concentrations Saposine B détectées dans les urines sont dépendantes de l'affinité et de la spécificité de l'anticorps utilisé, mais d'une façon générale, la tendance entre les trois groupes d'individus est conservée quelque soit l'anticorps utilisé.

Exemple 17 : Co-dosage des protéines GM2AP et Saposine B dans les urines.

La Figure 10 reporte les concentrations de GM2AP dosée dans les échantillons d'urine décrites dans la Figure 5 par rapport à la concentration de Saposine B dosée dans ces mêmes échantillons et décrite dans la Figure 6. Dans ce graphe sont reportés les échantillons SEP (losanges foncés) et les échantillons OND et 'Healthy' (losanges blancs).

Sur ce graphe, il apparaît clairement que :

- plus la concentration en GM2AP est élevée dans les urines, plus la concentration en Saposine B est élevée. (Nous avons montré que ce n'est pas un cas général avec d'autres protéines et que cela ne traduit pas une perturbation rénale, avec le dosage de la créatinine en parallèle pour chacun des échantillons testés.) :

- les concentrations élevées de GM2AP et Saposine B sont caractéristiques des échantillons SEP (à l'exception des deux urines de la population active, mentionnées ci-dessus). Ces concentrations élevées conjointes de GM2AP et Saposine B sont des marqueurs de la pathologie SEP, plus précisément d'une fenêtre de la maladie (quadrant à droite et en haut du graphe).

En conclusion, cette analyse confirme que des concentrations urinaires élevées de GM2AP (>400 ng/ml) et de Saposine B (>2 µg/ml) sont co-détectées dans les urines de patients SEP et peuvent représenter des marqueurs de la pathologie SEP, plus précisément d'une forme de la maladie, d'un stade de la maladie, d'une période d'activité, et peuvent être influencée par tout traitement en cours. Il est avantageux de doser les deux protéines en parallèle dans chaque échantillons, et de considérer les deux concentrations.

Dosage de GM2AP et Saposine B dans l'urine de deux patients en cinétique.

Patient SEP n°1 - Forme Rémittente Progressive.

Des urines de ce patients ont été prélevées au cours de l'évolution de sa maladie. Le patient a été hospitalisé à J0 pour une poussée. Il a subi à J1 un flash de corticoïdes puis a été suivi dans le temps d'un point de vue clinique (le flash a apporté une amélioration clinique). La figure 11 montre le profil de dosage du GM2AP et de la Saposine B dans ces urines au cours de l'évolution, et la figure 12 montre le profil du produit des deux concentrations en GM2AP et Saposine B, traduisant une co-détection de concentrations élevées. Les concentrations en GM2AP et Saposine B élevées au moment de la poussée et de l'hospitalisation, diminuent progressivement dans le temps après le flash de corticoïdes jusqu'à 90 jours.

Patient SEP n°2 - Forme Progressive.

Des urines de ce patients ont été prélevées au cours de l'évolution de sa maladie. Le patient a été hospitalisé à J0 pour une poussée. Il a subi à J1 un flash d'Endoxan puis a été suivi dans le temps d'un point de vue clinique (le flash a apporté une amélioration clinique et à J60, des signes d'aggravation de la maladie ont été observés). La figure 13 montre le profil de dosage du GM2AP et de la Saposine B dans ces urines au cours de l'évolution, et la figure 14 montre le profil du produit des deux concentrations en GM2AP et Saposine B, traduisant une co-détection de concentrations

élevées. Les concentrations en GM2AP et Saposine B élevées au moment de la poussée et de l'hospitalisation, diminuent progressivement dans le temps après le flash d'Endoxan (ou encore appelé cyclophosphamide) jusqu'à 23 jours et semblent augmenter pour devenir élevées à J60, montrant ainsi une parfaite corrélation avec l'évolution des signes cliniques.

Ces résultats confirment que :

- des concentrations fortes de GM2AP et Saposine B dans les urines sont des marqueurs de la pathologies SEP, et en particulier la co-détection des fortes concentrations des deux protéines conjointement (traduit par le produit des deux concentrations) ;

- les fortes concentrations de GM2AP et Saposine B dans les urines sont des marqueurs de l'activité de la maladie (ici pendant la poussée) ou sont des marqueurs influencés par les traitements immuno-suppresseurs comme les corticoïdes ou l'Endoxan qui abaissent les concentrations.

Cet exemple illustre le fait que ces marqueurs peuvent être utilisés entre autres :

- pour réaliser un suivi thérapeutique d'un patient et évaluer le bénéfice thérapeutique d'un traitement pour un patient donné ; ou
- de prédire une aggravation de la maladie, prédire un pic d'activité, etc...
- de décider une (re)prise thérapeutique anticipée sur les signes cliniques

Exemple 18 : Corrélation ente la détection des protéines MRP14, GM2AP et Saposine B dans les urines et la gliotoxicité mesurée dans ces urines.

Afin de vérifier une corrélation entre la présence de ces protéines seules ou en combinaison dans les urines et la gliotoxicité des urines, ont été dosées en parallèle les concentrations en protéine d'intérêt et la gliotoxicité d'un échantillonnage d'urines de patients atteints de sclérose en plaques (SEP), de patients atteints d'autres maladies neurologiques (OND) et d'individus issus de la population active dit « Healthy ». Parmi les patients SEP, on note des patients avec différentes formes et stades de la maladie, sous traitement ou non, à différentes activités de la maladie.

Les protéines MRP, GM2AP et Saposine B ont été dosées dans des urines humaines en suivant les protocoles Elisa décrits ci-dessus. Les dosages analysés dans

cet exemples sont ceux décrits dans les exemples précédents. Chaque échantillon d'urine analysé en Elisa a été analysé par le test MTT pour mesurer la gliotoxycité de chaque échantillon. La gliotoxycité est exprimée en pourcentage de cellules mortes (estimé par colorimétrie en utilisant les sels de tetrazolium) d'une lignée cellulaire astrocytaire murine (CLTT1.1) après 48 heures d'incubation en présence d'urine centrifugée.

La figure 15 représente la concentration en GM2AP en fonction de la gliotoxycité des urines déterminée par test MTT.

22 urines SEP (losanges gris), 5 urines AMN (losanges noirs) et 9 urines dites « Healthy » (losanges noirs) ont été reportés sur le graphe. Ce sont les mêmes urines qui ont été étudiées dans les exemples 15 et 16. On observe que toutes les urines témoins (OND et Healthy) ont des taux en GM2AP faibles (<400 ng/ml) et une gliotoxycité faibles (<15%), à l'exception d'une urine témoin Healthy (déjà commentée dans l'exemple 15) pour laquelle on observe une forte concentration en GM2AP et une gliotoxycité.

Les urines SEP sont réparties en trois sous-populations :

- urines à faible concentration en GM2AP (<400 ng /ml) et faible gliotoxycité (<15%),
- urines à faible concentration en GM2AP (<400 ng /ml) et gliotoxycité (>15%), soit essentiellement 3 urines,
- urines à forte concentration en GM2AP (>400 ng /ml) et forte gliotoxycité (>15%).

Ces trois sous populations traduisent peut-être des sous populations SEP, c'est-à-dire différentes formes ou stades de la maladie, différentes activités de la maladie, différents bénéfices thérapeutiques,

Cependant on peut noter que toutes les urines présentant une forte concentration en GM2AP présentent également une forte gliotoxycité.

En conclusion : on observe une corrélation entre concentration urinaire élevée en GM2AP et gliotoxycité (toutes les urines avec une forte concentration en GM2AP sont gliotoxiques (10/10), et toutes les urines avec une faible concentration en GM2AP ne sont pas gliotoxiques (<15%), à l'exception de 3 urines 12 SEP). Ceci traduit l'implication de la protéine GM2AP dans le mécanisme de gliotoxycité, seule ou

en combinaison, sous sa forme naturelle ou modifiée, mais reconnaissable par un anticorps anti-GM2AP. De plus la co-détection d'une forte concentration en GM2AP dans les urines et d'une forte gliotoxité corrèle avec une sous population de patients atteints de SEP.

La figure 16 représente la concentration en Saposine B en fonction de la gliotoxité des urines déterminée par test MTT.

22 urines SEP (losanges gris), 5 urines AMN (losanges noirs) et 9 urines dites «Healthy » (losanges gris clair) ont été reportés sur le graphe. Ce sont les mêmes urines qui ont été étudiées dans les exemples 15 et 16. On observe que plus les urines sont riches en Saposine B, plus elles sont gliotoxiques. Il y a une corrélation assez nette entre concentration de Saposine B et gliotoxité des urines.

En conclusion : on observe une corrélation entre concentration urinaire élevée en Saposine B et gliotoxité. Ceci traduit l'implication de la protéine Saposine B dans le mécanisme de gliotoxité, seule ou en combinaison, sous sa forme naturelle ou modifiée mais reconnaissable par l'anticorps anti-saposine B utilisé pour le dosage.

La figure 17 représente le produit des concentrations en GM2AP et Saposine B en fonction de la gliotoxité des urines déterminée par test MTT.

Les 22 urines SEP (losanges gris), 5 urines AMN (losanges noirs) et 9 urines dites «Healthy » (losanges gris clair) des exemples 15 et 16 ont été reportés dans la figure 17. La gliotoxité de ces urines est analysée en fonction du produit des concentrations en GM2AP et Saposine B, c'est-à-dire en fonction de la co-détection des deux protéines dans les urines. On observe très nettement une corrélation entre le produit des deux concentrations GM2AP et Saposine B et la gliotoxité, bien plus importante qu'en ne considérant qu'une seule protéine. On observe que 5/5 des urines OND ont un produit de concentration GM2AP et Saposine B faible et une gliotoxité faible : 8/9 urines « Healthy » ont un produit de concentration GM2AP et Saposine B faible et ou une gliotoxité faible. Par contre, on distingue essentiellement trois sous-populations d'urines SEP :

- urines a faible concentration en GM2AP.Saposine B et faible gliotoxité (< 15%).

- urines à forte concentration en GM2AP. Saposine B et forte gliotoxité (>15%).

Ces deux sous populations traduisent peut-être des sous populations SEP, c'est-à-dire différentes formes ou stades de la maladie, différentes activités de la maladie, différents bénéfices thérapeutiques, Cependant il est très important de noter que toutes les urines présentant une forte concentration en GM2AP et Saposine B, c'est-à-dire ayant conjointement une forte concentration en GM2AP et Saposine B, présentent également une forte gliotoxité. Les deux sous populations de patients SEP sont d'autant plus marquées et nettes que l'on considère conjointement les trois marqueurs : gliotoxité, concentration élevée en GM2AP et concentration élevée en Saposine B. Ceci est confirmé à la figure 18.

En conclusion : on observe une corrélation entre concentration urinaire élevée de GM2AP et Saposine B et Gliotoxité. Toutes les urines avec une forte concentration en GM2AP et Saposine B sont gliotoxiques, et toutes les urines avec une faible concentration en GM2AP et Saposine B ne sont pas gliotoxiques (<15%), à l'exception de 2 urines/22 SEP. Ceci traduit l'implication des deux protéines GM2AP et Saposine conjointement ou en combinaison dans le mécanisme de gliotoxité, sous leur forme naturelle ou modifiée mais reconnaissable par les anticorps anti-GM2AP et anti-saposine B utilisés pour le dosage. De plus la co-détection d'une forte concentration urinaire en GM2AP et Saposine B et d'une forte gliotoxité corréle avec une sous population de patients atteints de SEP (stade, forme, activité, traitement de la maladie ?), par rapport à une autre sous population. Ces trois marqueurs considérés conjointement permettent de discriminer entre deux sous populations de patients SEP.

Evolution de la gliotoxité et des concentrations en GM2AP et Saposine B en fonction de l'évolution de la maladie de deux patients après et pendant traitement.

La corrélation entre gliotoxité, forte concentration en GM2AP ET Saposine dans les urines et pathologie SEP a également été confirmée en mesurant ces trois paramètres dans l'urine de deux patients au cours de l'évolution de leur maladie.

Patient n°1 : SEP forme rémittente-progressive, hospitalisé à J0 pour une poussée et ayant reçu un flash de corticoïde à J1. Après le flash, il a montré une amélioration clinique jusqu'à J90 - (cf. figures 11,12).

Patient n°2 : SEP forme progressive, hospitalisé à J0 pour une poussée et ayant reçu un flash d'Endoxan (encore appelé cyclophosphamide) à J1. A J60, il présente de nouveaux des signes cliniques d'aggravation de sa maladie - (cf. figures 13,14).

5 Pour les deux patients, il a été montré :

- une corrélation entre la gliotoxicité urinaire et l'évolution clinique de la maladie (lorsque les signes cliniques sont sévères, la gliotoxicité est élevée ; lorsque les signes cliniques diminuent suite au traitement, la gliotoxicité diminue et devient stationnaire ; lorsque les signes d'aggravation apparaissent après le traitement, la

10 gliotoxicité semble augmenter de nouveau).

- une corrélation entre le taux de gliotoxicité dans les urines de patients et les concentrations de GM2AP et Saposine B, et

- une corrélation entre les concentrations élevées de GM2AP et Saposine B et l'évolution clinique de la maladie.

15 En conclusion : le dosage des protéines GM2AP ET Saposine B dans les urines est un bon marqueur discriminatif d'une sous population de la SEP (stade, forme, activité, traitement de la maladie). Les protéines GM2AP et/ou Saposine B sont impliquées dans le mécanisme de gliotoxicité, seules ou en combinaison, sous leur

20 forme naturelle ou sous une forme reconnaissable par les anticorps polyclonaux utilisés pour leur dosage. Comme les protéines GM2AP et Saposine sont co-détectées en forte concentration dans les urines gliotoxiques, il est possible que ces deux protéines agissent en combinaison pour induire la gliotoxicité.

Exemple 19 : Analyse immunohistochimique de l'expression des protéines

25 GM2A, SAPB, MRP14 et MRPS dans un système de culture producteur de gliotoxine in vitro (cultures de monocytes), ainsi que dans le tissu cérébral normal et pathologique de SEP et de témoins.

Protocole : Des cultures de monocytes d'un patient atteint de SEP et d'un témoin sain ont été réalisées en parallèle, selon le protocole présent décrit brièvement.

30 A partir de sang périphérique de ces deux volontaires prélevé sur ACD, les PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) sont isolés sur Ficoll en utilisant la technique connue de l'homme de l'art. Les cellules récupérés (au niveau de l'anneau) sont lavées

deux fois en milieu RPMI. Les cellules sont alors énumérées sur Kova-slide et sont
ensemencées en flacon primaire de 25 cm² ou sur lame Labteck (8 cupules) (en
permanox) en milieu RPMI supplémenté avec 15% de sérum AB humain à J0. Les
cellules sont cultivées sur des lames alvéolées de type « Labtek » afin de disposer d'un
5 support direct pour l'analyse des monocytes qui adhèrent au support et se différencient
ultérieurement en macrophages. Pour les lames, $2 \cdot 10^6$ cellules sont ainsi ensemencées à
raison de $0,25 \cdot 10^6$ cellules/puits. Pour les flacons, $4 \cdot 10^6$ cellules sont ensemencées à
raison de $0,25 \cdot 10^6$ cellules/puits. A J1, les cellules en suspension sont récupérées et les
puits des Labteck ou les flacons sont lavés deux fois en RPMI (au préalable chauffé à
10 37°C) avant de rajouter du milieu RPMI supplémenté avec 5% de sérum AB humain.
A J1, J3, J6, J9, J12 ou 14, J15 le milieu de culture est changé ; les surnageants sont
prélevés et les cellules fixées sur lames en utilisant les techniques connues de l'homme
de l'art. A chaque changement de milieu, au moins deux lames ont été fixées en
paraformaldéhyde et conservées pour l'analyse immunohistochimique.

15 Composition du milieu : RPMI (500 ml) avec 15ml de glutamate 200
mM, 5 ml de pyruvate de sodium 100 μ M, 5 ml d'acides aminés non essentiels (100x),
des antibiotiques pénicilline et streptomycine 100 000 U / μ l et des anticorps anti-
interferon humains à 100 U/ μ l.

Résultats : Quatre cultures de monocytes *in vitro* ont été ainsi étudiées en
20 cinétique : deux cultures de monocytes issus de sang d'individus contrôles et deux
cultures de monocytes issus de patients SEP. A différents temps de la culture (J0, J1,
J3, J6, J9, J12,), les surnageants correspondants ont été également récupérés. Une
fois la cinétique complétée, les lames correspondant aux différents jours de cultures ont
été incubées en présence d'anticorps polyclonaux anti-GM2A, SAP-B, MRP-8 et
25 MRP14. La gliotoxicité de chaque surnageant ainsi récupéré a été estimée par test MTT.
La concentration en protéine GM2AP, MRP14 et Saposine B a également été
déterminée dans chaque surnageant par protocole Elisa comme décrit dans les
exemples 13 et 14.

Les résultats d'immunofluorescence sur cellules fixées sont résumés ci-
30 dessous ; on peut noter :

- une absence d'expression de MRP8 à tous les stades des 2 cultures

- une expression nette de MRP-14 dans la période entre J9 et J15, retrouvée dans les deux cultures, quoique plus forte dans la culture SEP. Cette expression semble corrélérer une étape de différenciation macrophagique.

- une très faible expression (faible intensité et faible nombre de cellules) est observée en début de culture dans la culture témoin et correspond vraisemblablement à la présence physiologique de GM2A dans les lysosomes macrophagiques.

- Dans la culture SEP, une expression beaucoup plus nette de GM2A (plus forte intensité et nombre de cellules plus important) est observée, avec un marquage cytoplasmique relativement homogène entre J3 et J6, disparaît à J9 et est à nouveau notée à J14-J15 avec un marquage intense et localisé à la périphérie cytoplasmique, dessinant le contour interne de la membrane plasmique. Ces observations ne sont pas retrouvées dans l'ensemble des lames témoins.

L'analyse avec le anticorps anti-SAP-B n'a pas permis d'obtenir un marquage immuno-histochimique interprétable.

Dans les cultures de monocytes SEP déjà effectuées, 3/3 ont présenté un pic de gliotoxicité à J9 et 2/3 un pic plus faible à J6. Aucun pic n'étant détecté dans les cultures de monocytes de 2/2 témoins non-SEP analysés en parallèle. De même, le dosage des protéines MRP14, GM2AP et Saposine B dans le surnageant des cultures cellulaires au cours de la cinétique a montré que les protéines SapB et GM2AP sont détectées par Elisa dans les surnageants des monocytes SEP et non dans ceux des monocytes témoins, aux jours J6 et surtout J9 de la culture : les protéines ne sont pas détectées au-delà de cette cinétique. Notons que les anticorps utilisés pour le dosage peuvent reconnaître les formes physiologiques des protéines, mais également des formes complexées et/ou modifiées.

On constate donc que la période J6-J9 pendant laquelle on observe une gliotoxicité la plus importante dans le surnageant, est couverte par la période J3-J15 pendant laquelle on observe une production moins différenciée du témoin négatif de GM2A dans les cellules avec des fluctuations quantitatives et qualitatives de son expression cellulaire (quantité d'expression et localisation cellulaire).

Exemple 20: Technique d'immunohistologie sur coupes de cerveaux en paraffine.

Les coupes histologique préparées en paraffine sont déparaffinées en xylène et alcool avant de subir un prétraitement qui a pour but de démasquer les antigènes : ce prétraitement peut correspondre à (i) deux fois 5 minutes sous micro-
5 onde (750W) en présence d'un tampon citrate de sodium, acide citrique, (ii) un traitement à l'acide par incubation 15 minutes dans une solution d'acide périodique 1% ou par incubation 5 minutes dans une solution d'acide formique 99%. Les peroxydases endogènes sont ensuite bloquées par incubation des lames 30 minutes en eau oxygénée
10 1% puis lavage extensif en eau pendant 15 minutes. Le bruit de fond est bloqué en incubant les lames 30 minutes en présence de PBS Triton 0.03%, 10% sérum Donkey (pour les anticorps polyclonaux) ou 10% sérum Goat (pour les anticorps monoclonaux). Un marquage avec l'anticorps primaire est réalisé en appliquant 100 à 200 µl de solution d'anticorps primaire par lame (0.5 à 5 µg /ml selon le titre) dans du
15 PBS Triton 0.03% puis en incubant 2 heures à température ambiante. Les lames sont ensuite rincées 3 fois en PBS-Triton pendant 10 minutes. Un marquage anticorps secondaire est réalisé en utilisant des anticorps biotinylés capables de se fixer spécifiquement aux anticorps primaires, par exemples des anti-IgG de lapin ou anti-IgG de souris dilués dans du PBS-Triton 0.03%. les lames sont lavées et incubées dans une
20 solution pendant 2 heures (2 µl complexe streptavidine-biotine-peroxydes, 1600 µl PBS-Triton 0.03%). Les lames sont de nouveau lavées avant d'être révélées à l'abri de la lumière dans le tampon A puis rincées à l'eau avant observation microscopique. Tampon A pour 5 lames : 25 ml Tris 0.05M pH 7.6, 2.5 ml Imidazole 1M, 15 ml eau stérile, 2 ml DAB 5 mg/ml, 5 ml Nickel d'ammonium 10%, 30 µl H₂O₂ 1%.

25 Les mêmes anticorps ont été utilisés pour une étude immunohistochimique, selon la technique décrite brièvement ci-dessous, sur lames paraffinées obtenues par coupe au microtome de cerveaux prélevés post-mortem de SEP et de témoins décédés de pathologies non-neurologiques.

Les résultats de l'analyse sont résumés ci-dessous :

30 Il n'y a pas de marquage des cerveaux « non-SEP » et SEP dans la substance grise et la substance blanche « normale (non lésée) avec les différents anticorps anti- MRP8, MRP14, GM2A. Une réactivité non spécifique n'a pas permis

d'interpréter les résultats avec l'anticorps anti-saposine B dans cette application immunohistochimique.

Par contre on note, dans les zones de plaques des cerveaux SEP :

- une réactivité anti-MRP14 dans les cellules macrophagiques et microgliales, ayant une distribution relativement homogène sur toute l'étendue des zones de démyélinisation (plaques).
- une plus faible (moins fréquente) réactivité anti-MRP8 liée essentiellement aux infiltrats lymphoïdes périvasculaires
- une nette réactivité anti-GM2A dans les macrophages et microgliocytes des zones de plaques, avec une densité particulière dans les zones constituant le « mur glial » en limite périphérique de plaque. Un marquage de quelques astrocytes a aussi été retrouvé dans les zones de démyélinisation.

Ces différentes observations montrent qu'il existe une hyperexpression particulière des protéines MRP-14 et GM2A dans les cultures de monocytes de SEP produisant une activité gliotoxique dans leur surnageant, ainsi que dans les zones définissant des plaques de démyélinisation dans les cerveaux de SEP. Elles témoignent donc de la réalité de la coïncidence entre leur co-expression anormale, la production d'activité gliotoxique et les lésions de démyélinisation.

De plus, leur production anormale dans le contexte de la SEP, dans les cellules macrophagiques sanguines ainsi que dans celles du cerveau, indique qu'il est fondé de réaliser leur dosage dans les fluides biologiques pour corréler leur quantité avec l'activité lésionnelle et inflammatoire de la SEP.

Exemple 21 : Mesure de l'activité des cellules T par prolifération des cellules T (Sredni et al., 1981).

Les cellules T sont lavées deux fois en milieu de culture pour éliminer toute trace d'IL2 présente dans le milieu initial de culture. Des lymphocytes B (EBV-LCL) ou des monocytes macrophages pris comme cellules présentatrices de l'antigène, sont irradiées à 10000 rads, lavées deux fois avec du milieu de culture (RPMI). 2.10⁴ cellules T (2.10⁴ cellules/ml) et 2.10⁴ cellules B autologues irradiées (2.10⁴ cellules/ml) sont incubées ensemble en présence d'une gamme de concentration croissante de

l'antigène sous un volume final de 200 µl dans des micropuits. Après 48 heures de culture à 37°C, 1 µCi de 3H- thymidine dans 50 µl de milieu RPMI est ajouté dans chaque puits. Les cellules T, seules à se diviser, incorporent la thymidine tritiée dans l'ADN. Après 18 heures de culture, les cellules de chaque micropuits sont récoltées sur des pastilles de laine de verre par aspiration. Après lyse osmotique des cellules, la radioactivité incorporée dans l'ADN est absorbée sur les pastilles (cell Harvester 530, Inotech). Chaque pastille séchée est placée dans un tube plastique qui contient 2 ml de scintillant : la radioactivité adsorbée sur chacune des pastilles est quantifiée dans un compteur bêta à scintillation liquide (LKB Rackbeta 1217). Les résultats sont exprimés comme moyenne arithmétique de cpm/culture ('coups par minute').

Exemple 22 : Protocole de détection de l'association entre les peptides et les molécules d'histocompatibilité (approche APC transformées avec un peptide se fixant au CMH I).

1) Matériel :

Les sources de molécules d'histocompatibilité sont actuellement de deux types principaux : les cellules mutantes et les molécules d'histocompatibilité purifiées.

La cellule mutante utilisée est la cellule humaine T2 qui est un variant de la lignée T1 produite par fusion du lymphome T CEM et du lymphome B 721.174 (Salter and Cresswell Embo J 1986, 5: 943-949). Cette cellule qui est dépourvue de transporteurs de peptides contient des chaînes lourdes de molécules de classe I libres de peptides qui vont pouvoir accepter de peptides exogènes.

Des molécules d'histocompatibilité de classe I purifiées par chromatographie d'affinité à partir de lignées de cellules B humaines transformées par l'EBV peuvent être également utilisées. Dans ce cas les peptides endogènes doivent être éliminés par un traitement avec de l'urée 1.5 M et de la soude 12.5 mM (pH 11.7) pendant 1 heure à 4°C, suivi de leur élimination par une colonne de désalage (PDLO, Pharmacia). Les molécules d'histocompatibilité sont immédiatement remises en présence des peptides à tester dans un tampon PBS avec 0.05% Tween 20, 2 mM EDTA, 0.1% NP40 et 6 mM CHAPS, en présence de 2 µg/ml B2m pour faciliter la réassociation (Gnjatic et al., Eur J Immunol 1995 25 : 1638-1642).

Les peptides testés ont en général 8 à 10 résidus, parfois 11 ou 12. Ils ont été synthétisés par Néosystems (Strasbourg), ou par Chiron mimotopes (Victoria, Australie). Ils sont utilisés à des concentrations variant de 100 μ M à 0.1 nM.

2) Protocole de l'assemblage (Connan et al., Eur J Immunol 1994, 24 : 777 ; Couillin et al. Eur J Immunol 1995, 25 : 728-732).

Des aliquotes de 8.105 cellules dans un volume de 64 μ l, répartis dans des tubes microfuge Eppendorf, sont mis en présence d'un tampon de lyse contenant 10 mM PBS, pH 7.5 1% NP40, des inhibiteurs de protéases (1 mM PMSF, 100 μ M iodoacétamide, 2 μ g /ml aprotinine, 10 μ M leupeptine, 10 μ M pepstatine et 10 μ g/ml inhibiteur de trypsine). La lyse se fait en présence des peptides à tester pendant 30 minutes ou 1 heure à 37°C. Après élimination du matériel non solubilisé par une centrifugation à 15 000 tours /minute à 4°C, le surnageant est additionné de 140 μ l de PBS contenant 0.05% de Tween 20, 3 mM d'azide de sodium, 1 mM PMSF et 10 mg /ml d'albumine bovine. Chaque échantillon est incubé pendant 20 heures à 4°C dans 2 puits d'une plaque à microtitration de type Nunc.Maxisorb, préalablement recouverts d'un anticorps monoclonal (10 μ g /ml en PBS) qui reconnaît les molécules d'histocompatibilité ayant une(des) conformation(s) conforme(s) pour la présentation de peptides et semblable(s) à celle(s) présente(s) à la surface des cellules. La plaque recouverte d'anticorps est préalablement saturée par de l'albumine bovine à 10 mg /ml dans du PBS-Tween avant la mise de l'échantillon. Le second anticorps qui permet la détection de l'assemblage des molécules d'histocompatibilité est dirigé contre la B2m. Il est couplé soit à la biotine (NHS-LC biotin, Pierce) soit à la phosphatase alcaline (P-552, Sigma) et est incubé à 2 μ g /ml pendant une heure à 37°C. Dans le cas de l'emploi de la biotine, une incubation de 45 minutes à 20-25°C avec de la streptavidine couplée à la phosphatase alcaline (E-2636, Sigma) est réalisée. L'activité de la phosphatase alcaline est mesurée en utilisant comme substrat le 4-méthyl-umbelliféryl-phosphate (M-8883, Sigma) à 100 μ M dans de la diéthanolamine 50 mM, pH 9.5 avec du MgCl2 1 mM. La lecture est faite à 340-460 nm à l'aide d'un cytofluorimètre.

3) Stabilité des complexes HLA peptides :

La stabilité des complexes précités a été étudiée car elle conditionne la bonne présentation de l'antigène et l'induction de la réponse T. A cet effet, on a utilisé soit du HLA purifié, soit le lysat de la cellule T2. Avec le HLA purifié, on a éliminé les

peptides endogènes (comme décrit en 2)) puis on l'a mis en présence du peptide à tester en tube Eppendorf à 37°C, pendant des temps variables de quelques minutes à plusieurs jours. La phase suivante d'incubation sur plaque de 96 puits (comme décrit en 2) avec l'anticorps anti-HLA se fait pendant une heure à 37°C. La révélation est effectuée de
5 manière classique. Avec le lysat de la cellule T2, toutes les incubations sont également faites à 37°C, après ajout de tous les inhibiteurs de protéases.

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 à SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

2. Utilisation d'au moins deux polypeptides en combinaison, lesdits polypeptides comprenant chacun au moins un fragment d'une protéine, pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et ou neurologique et ou auto-immune, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à une séquence peptidique choisie parmi SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 à SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine

plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

3. Utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 17 et SEQ ID N° 24 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 17 et SEQ ID N° 24.

4. Utilisation selon la revendication 3, de cinq polypeptides en combinaison, lesdits polypeptides comprenant chacun au moins un fragment d'une protéine, pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 17 et SEQ ID N° 24 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 17 et SEQ ID N° 24.

5. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que la séquence peptidique dudit polypeptide comprend une séquence choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 17 et SEQ ID N° 24.

6. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que la séquence peptidique dudit polypeptide consiste en une séquence choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 17 et SEQ ID N° 24.

7. Utilisation d'un fragment polypeptidique défini dans la revendication 1 ou dans la revendication 3 pour la préparation d'un peptide immunogène, caractérisé en ce que ledit peptide comprend tout ou partie d'au moins une des séquences référencées SEQ ID N° 58 à 65.

5 8. Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique, pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, selon laquelle ledit fragment nucléotidique est choisi parmi des fragments qui codent pour au moins un fragment
10 d'une protéine, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ
15 ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 à 29, les fragments complémentaires desdits fragments et les
20 fragments qui codent pour les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

9. Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que ledit
25 fragment nucléotidique code pour ladite protéine.

10. Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que la séquence peptidique de ladite protéine à l'état natif consiste en une séquence choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 1 à 8 et SEQ ID N° 10 à 29 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies
30 parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

11. Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune selon laquelle ledit fragment est un
5 fragment d'une séquence nucléique choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 30, SEQ ID N° 31, SEQ ID N° 32, SEQ ID N° 33, SEQ ID N° 34, SEQ ID N° 35, SEQ ID N° 36, SEQ ID N° 37, SEQ ID N° 38, SEQ ID N° 39, SEQ ID N° 40, SEQ ID N° 41, SEQ ID N° 42, SEQ ID N° 43, SEQ ID N° 44, SEQ ID N° 45, SEQ ID N° 46 et SEQ ID N° 47, SEQ ID N° 48, SEQ ID N° 49 et SEQ ID N° 50, SEQ ID N° 51, SEQ ID N°
10 52, SEQ ID N° 53, SEQ ID N° 54, SEQ ID N° 55, SEQ ID N° 56, SEQ ID N° 57, SEQ ID N° 67, SEQ ID N° 66, SEQ ID N° 69, SEQ ID N° 70 et SEQ ID N° 71 et leurs séquences complémentaires.

12. Utilisation d'un ligand spécifique d'un polypeptide ou d'un fragment nucléotidique selon l'une quelconque des revendications précédentes pour obtenir une
15 composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune.

13. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la maladie dégénérative et/ou auto-immune est la sclérose en
20 plaques.

14. Procédé pour détecter au moins une protéine associée à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce que l'on met en contact l'échantillon biologique avec au moins un ligand spécifique d'au moins un polypeptide, ledit polypeptide comprenant au moins un fragment d'une
25 protéine et ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N°
30 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 %

d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 à 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B, puis on détecte la formation d'un complexe entre ledit polypeptide et ledit ligand.

15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que ledit ligand est un anticorps monoclonal, un anticorps polyclonal, un récepteur, un substrat d'activité enzymatique ou une enzyme dont ledit polypeptide est un cofacteur.

16. Procédé pour détecter au moins un ligand associé à une maladie dégénérative et ou auto-immune, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce que l'on met en contact l'échantillon biologique avec au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 à SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B, puis on détecte la formation d'un complexe entre ledit polypeptide et ledit ligand.

17. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que le ligand est un anticorps, un récepteur, un substrat d'activité enzymatique ou une enzyme dont ledit polypeptide est un cofacteur.

18. Procédé selon l'une quelconque des revendications 14 à 17, caractérisé en ce que la séquence dudit polypeptide comprend une séquence peptidique choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 1 à 8 et SEQ ID N° 10 à 29.

19. Procédé selon l'une quelconque des revendications 14 à 17, caractérisé en ce que la séquence dudit polypeptide consiste en une séquence peptidique choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 1 à 8 et SEQ ID N° 10 à 29.

20. Procédé selon l'une quelconque des revendications 14 à 19, caractérisé en ce que l'échantillon biologique est l'urine, le liquide céphalo-rachidien ou le sérum.

21. Procédé selon l'une quelconque des revendications 14 à 20, caractérisé en ce que la maladie dégénérative et/ou auto-immune est la sclérose en plaques.

22. Polypeptide caractérisé en ce qu'il comprend au moins un fragment d'une protéine dont la séquence peptidique correspond à SEQ ID N° 9, ledit fragment comprenant au moins une mutation par rapport à la séquence de référence SEQ ID N° 8.

23. Polypeptide selon la revendication 22, caractérisé en ce qu'il comprend au moins deux mutations par rapport à la séquence de référence SEQ ID N° 8.

24. Polypeptide selon la revendication 22, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les polypeptides qui comprennent la séquence en acides aminés FSWDNCFEGKDPVIR, référencée SEQ ID N° 68 et la séquence en acides aminés YSLPKSEFAVPDLELP, référencée SEQ ID N° 72.

25. Polypeptide selon l'une des revendications 22 à 24, caractérisé en ce qu'il comprend une protéine dont la séquence peptidique correspond à SEQ ID N° 9.

26. Polypeptide selon l'une des revendications 22 à 25, caractérisé en ce qu'il consiste en une protéine dont la séquence peptidique correspond à SEQ ID N° 9.

27. Utilisation d'au moins un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 22 à 26 pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune.

28. Utilisation selon la revendication 26, caractérisée en ce que le polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 22 à 26 est utilisé

en mélange avec au moins un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 5.

29. Procédé pour détecter au moins un ligand associé à une maladie dégénérative et ou auto-immune, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce que
5 l'on met en contact l'échantillon biologique avec au moins un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 22 à 26, puis on détecte la formation d'un complexe entre ledit polypeptide et le ligand.

30. Procédé selon la revendication 29, caractérisé en ce que l'on met en
10 contact l'échantillon biologique avec un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 22 à 26 et avec au moins un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 5.

31. Procédé selon la revendication 29 ou 30, caractérisé en ce que ledit
15 ligand est un anticorps, un récepteur, un substrat d'activité enzymatique ou une enzyme dont ledit polypeptide est un cofacteur.

32. Procédé pour détecter au moins un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 22 à 26 dans un échantillon biologique caractérisé
20 en ce que l'on met en contact l'échantillon biologique avec au moins un ligand spécifique dudit polypeptide, puis on détecte la formation d'un complexe entre ledit polypeptide et ledit ligand.

33. Procédé selon la revendication 32, caractérisé en ce que ledit ligand est
25 anticorps monoclonal, un anticorps polyclonal, un récepteur, un substrat d'activité enzymatique ou une enzyme dont ledit polypeptide est un cofacteur.

34. Procédé selon la revendication 30 ou 31, caractérisé en ce que l'on met
en contact l'échantillon biologique avec un ligand tel que défini dans l'une quelconque
30 des revendications 31 et 33 et au moins un ligand spécifique d'au moins un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 5, puis on détecte la

formation de complexes entre lesdits polypeptides et lesdits ligands spécifiques desdits polypeptides.

35. Procédé selon la revendication 34, caractérisé en ce que le ligand est
5 un anticorps monoclonal, un anticorps polyclonal, un récepteur, un substrat d'activité enzymatique ou une enzyme dont ledit polypeptide est un cofacteur.

36. Fragment nucléotidique caractérisé en ce qu'il code pour un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 22 à 26.

10

37. Utilisation d'un fragment nucléotidique pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, selon laquelle ledit fragment nucléotidique est le
15 fragment nucléotidique défini dans la revendication 35, éventuellement en association avec au moins un fragment nucléotidique tel que défini dans l'une quelconque des revendications 8 à 11, et les fragments complémentaires desdits fragments.

38. Procédé selon l'une quelconque des revendications 29 à 35, caractérisé
20 en ce que l'échantillon biologique est l'urine, le liquide céphalo-rachidien ou le sérum.

39. Procédé selon l'une quelconque des revendications 29 à 36 caractérisé en ce que la maladie dégénérative et/ou auto-immune est la sclérose en plaques.

40. Procédé pour détecter au moins un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou dans l'une quelconque des revendications 22 à 26, selon lequel on prélève un échantillon d'un fluide biologique d'un patient présentant un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune et éventuellement après purification dudit échantillon de fluide
25 biologique, on analyse par spectrométrie de masse le profil de masse obtenu à partir du fluide biologique et on compare à un profil de masse de référence.
30

41. Utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 8 à SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B, et de préférence SEQ ID Nos : 8, 9, 17 et 24.

42. Utilisation, selon la revendication 41, dans laquelle les séquences peptidiques sont comprennent les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le précurseur de l'activateur du ganglioside GM2 et de la saposine B.

43. Utilisation, selon l'une quelconque des revendications 41 ou 42, qui est associée à l'utilisation d'une détection d'une activité gliotoxique.

44. Procédé de diagnostic ou de pronostic dans lequel on dose au moins un polypeptide, selon l'une quelconque des revendications 41 à 43, pour détecter ou prévenir un état pathologique, le dosage permettant d'obtenir une valeur de concentration qui est comparée à une valeur seuil représentative d'une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune.

45. Procédé, selon la revendication 44, dans lequel la valeur seuil est obtenu par un test ELISA pour un échantillon d'urine, cette valeur étant de :

- 400 ng/ml pour le précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, pour l'anticorps GM2AP84, et
- 2 µg/ml pour la saposine B, pour l'anticorps SAPB84.

5 46. Procédé de diagnostic ou de pronostic dans lequel on détecte au moins un polypeptide, selon l'une quelconque des revendications 41 à 43, pour prévenir un état pathologique, la détection s'effectuant dans des cellules ou dans les surnageants desdites cellules d'un patient susceptible d'être atteint par une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune.

10

 47. Procédé, selon la revendication 46, dans lequel la détection s'effectue sur des cellules monocytes ou macrophages ou dans les surnageants de ces cellules issues d'un patient susceptible d'être atteint par une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune.

15

 48. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 46 ou 47, dans lequel la détection s'effectue sur des cellules ou dans les surnageants de ces cellules en culture, après un délai compris entre 6 et 12 jours de culture, préférentiellement après 9 jours.

20

 49. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 46 ou 47, dans lequel la détection s'effectue sur des cellules, in vivo ou ex vivo, préférentiellement monocytes ou macrophages, dans des cerveaux de patient susceptible d'être atteint par une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune.

25

 50. Utilisation ou procédé, selon l'une quelconque des revendications 41 à 49, caractérisée en ce que la maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune est la sclérose en plaques ou bien une forme (progressive, rémittente, rémittente-progressive) ou phase d'activité (poussées) de cette maladie.

30

 51. Utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour tester l'efficacité d'un agent thérapeutique, ladite

protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

52. Utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, telle que la sclérose en plaques, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline et de la saposine.

53. Utilisation selon la revendication 51 ou 52, caractérisée en ce que le polypeptide est choisi parmi SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24.

54. Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique, pour tester
5 l'efficacité d'un agent thérapeutique pour un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, selon laquelle ledit fragment nucléotidique est choisi parmi les fragments qui codent pour au moins un fragment d'une protéine, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ
10 ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, les séquences peptidiques qui
15 présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les fragments complémentaires desdits fragments et les fragments qui codent pour les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine
20 plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

55. Utilisation pour tester l'efficacité d'un agent thérapeutique pour un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-
25 immune, de protéines recombinantes et/ou codées par tout ou partie des fragments nucléotidiques définis à la revendication 54.

56. Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une maladie dégénérative
30 et/ou neurologique et/ou auto-immune, telle que la sclérose en plaques, selon laquelle ledit fragment nucléotidique est choisi parmi des fragments qui codent pour au moins un fragment d'une protéine, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la

séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les fragments complémentaires desdits fragments et les fragments qui codent pour les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

57. Utilisation pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, telle que la sclérose en plaques, de protéines recombinantes et/ou codées par tout ou partie des fragments nucléotidiques définis à la revendication 56.

58. Utilisation selon la revendication 54 ou 56, caractérisée en ce que ledit fragment nucléotidique code pour ladite protéine.

59. Utilisation selon la revendication 58, caractérisée en ce que la séquence peptidique de ladite protéine à l'état natif consiste en une séquence choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 1 à 29, les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

60. Utilisation selon la revendication 59, caractérisée en ce que les polypeptides sont choisis parmi SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24.

61. Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique, pour tester
5 l'efficacité d'un agent thérapeutique pour un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune selon laquelle ledit fragment est un fragment d'une séquence nucléique choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 30, SEQ ID N° 31, SEQ ID N° 32, SEQ ID N° 33, SEQ ID N° 34, SEQ ID N° 35, SEQ ID N° 36, SEQ ID N° 37, SEQ ID N° 38, SEQ ID N° 39, SEQ ID N° 40, SEQ ID N° 41,
10 SEQ ID N° 42, SEQ ID N° 43, SEQ ID N° 44, SEQ ID N° 45, SEQ ID N° 46 et SEQ ID N° 47, SEQ ID N° 48, SEQ ID N° 49 et SEQ ID N° 50, SEQ ID N° 51, SEQ ID N° 52, SEQ ID N° 53, SEQ ID N° 54, SEQ ID N° 55, SEQ ID N° 56, SEQ ID N° 57, SEQ ID N° 66, SEQ ID N° 67, SEQ ID N° 69, SEQ ID N° 70, SEQ ID N° 71, et leurs séquences complémentaires.

15

62. Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, telle que la sclérose en plaques selon laquelle ledit fragment est un fragment d'une séquence nucléique choisie parmi l'une
20 quelconque des SEQ ID N° 30, SEQ ID N° 31, SEQ ID N° 32, SEQ ID N° 33, SEQ ID N° 34, SEQ ID N° 35, SEQ ID N° 36, SEQ ID N° 37, SEQ ID N° 38, SEQ ID N° 39, SEQ ID N° 40, SEQ ID N° 41, SEQ ID N° 42, SEQ ID N° 43, SEQ ID N° 44, SEQ ID N° 45, SEQ ID N° 46 et SEQ ID N° 47, SEQ ID N° 48, SEQ ID N° 49 et SEQ ID N° 50, SEQ ID N° 51, SEQ ID N° 52, SEQ ID N° 53, SEQ ID N° 54, SEQ ID N° 55, SEQ
25 ID N° 56, SEQ ID N° 57, SEQ ID N° 66, SEQ ID N° 67, SEQ ID N° 69, SEQ ID N° 70, SEQ ID N° 71, et leurs séquences complémentaires.

63. Utilisation selon la revendication 61 ou 62, caractérisée en ce que la séquence nucléique est choisie parmi SEQ ID N° 30, 31, 42, 53.

30

64. Utilisation de la lycorine pour la préparation d'une composition pour la prévention et/ou le traitement de maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune.

Lapins anti GM2

➤ Ganglioside GM2 activator

2 peptides de 13,15 acides aminés lapins 189 190

1 peptide de 18 acides aminés lapin 191 et 192

MQSLMQAPLL IALGLLLATP AQAHKKPSQ

LSSFWDNCD EGKDPVIRS LTLEPDPIVV

PGNVTLSVVG STSVPLSSPL KVDLVLEKEV

AGLWIKIPCT DYIGSCTFEH FCDVLDMLIP

TGEPCEPLR TYGLPCHCPF KEGTYSLPKS

EFVVPDLELP SWLTTGNYRIESVLSSSGKR

LGCIKIAASLKG

GM2A

ATG CAG TCC CTG ATG CAG GCT CCC CTC CTG ATC GCC CTG GGC TTG CTT CTC GCG ACC CCT GCG CAA GCC CAC CTG
 H Q S L H Q A P L L I A L G L L A T P A T P A Q A H L
 CCA TCC CAG CTC AGT AGC TTT TCC TGG GAT AAC TGT GAT GAA GGG AAG GAC CCT GCG GTG ATC AGA AGC CTG ACT
 P S Q L S S F S W D N C D E G K D P A V I R S L T
 CCT GAC CCC ATC GTC GTT CCT GGA AAT GTG ACC CTC AGT GTC GTG GGC AGC ACC AGT GTC CCC CTG AGT TCT CCT
 P D P I V V P G N V T L S V G S T
 GTG GAT TTA GTT TTG GAG AAG GAG GTG GCT GGC CTC TGG ATC AAG ATC CCA TGC ACA GAC TAC ATT GGC AGC TGT
 V D L V L E K E V A G L W I K I P C T D Y I G S C
 GAA CAC TTC TGT GAT GTG CTT GAC ATG TTA ATT CCT ACT GGG GAG CCC TGC CCA GAG CCC CTG CGT ACC TAT GGG
 E H F C D V L D H L I P T G E P C P E L R T Y G
 TGC CAC TGT CCC TTC AAA GAA GGA ACC TAC TCA CTG CCC AAG AGC GAA TTC GTT GTG CAC CTG GAG CTG CCC
 F C H C P F K E G T Y S L P K S E V V P D L E L P
 CTC ACC ACC GGG AAC TAC CGC ATA GAG AGC CTC CTG AGC AGC AGT GGG GAG CGT CTG GGC ATC AAG ATC GCT
 L T T G N Y R I E S S V L S S G K R L G C I K I A
 CTA AAG GGC ATA
 L K G I

FIG. 1

3/18

Lapin anti Saposine

3 peptides de 12,15, 15 acides aminés lapin 74-75
3 peptides de 12,15,15 acides aminés lapin 72-73

GDVCQDCIQM VTDIQTAVRT NSTFVQALVE
HVKEECDRLG PGMADICKNY ISQYSEIAIQ
MMMHHMQDQQP KEICALVGFC DEV

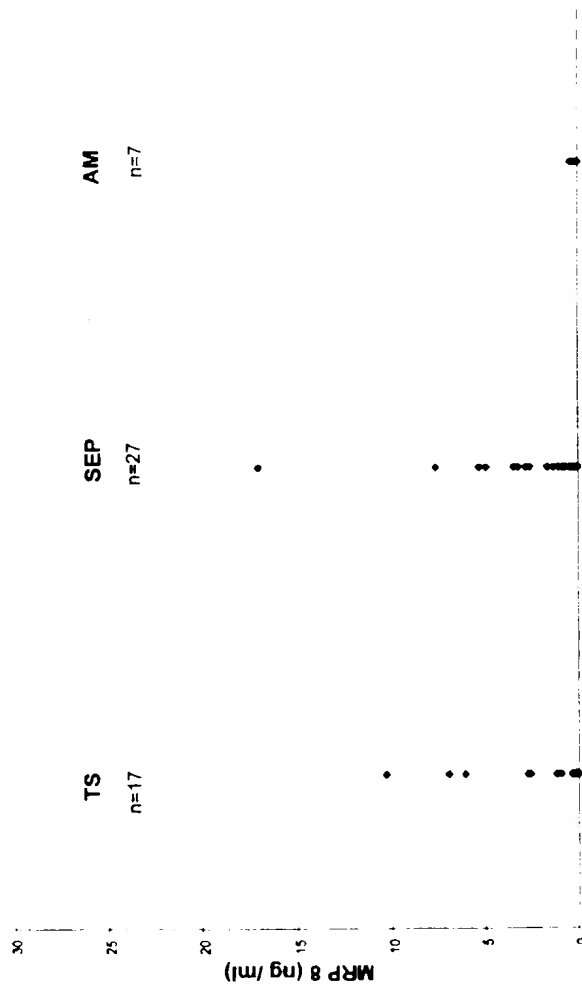
Sap
ATG GGG GAC GTT TGC CAG GAC TGC ATT CAG ATG GTG ACT GAC ATC CAG ACT GCT GTA CGG ACC AAC TCC ACC TTT GTC CAG
GCC
M G D V C Q D C I Q M V T D I Q T A V R T N S T F V Q
A
TTG GTG GAA CAT GTC AAG GAG GAG TGT GAC CGC CTG GGC CCT GGC ATG GCC GAC ATA TGC AAG AAC TAT ATC AGC CAG TAT
TCT
L V E H V K E E C D R L G P G M A D I C K N Y I S Q Y
S
GAA ATT GCT ATC CAG ATG ATG ATG CAC ATG CAA CCC AAG GAG ATC TGT GCG CTG GTT GGC TTC TGT GAT GAG TGA
E I A I Q M M M H M Q P K E I C A L V G F C D E *

FIG. 3

Dosage MRP 8

4/19

FIG. 4



5/18

Dosage MRP14

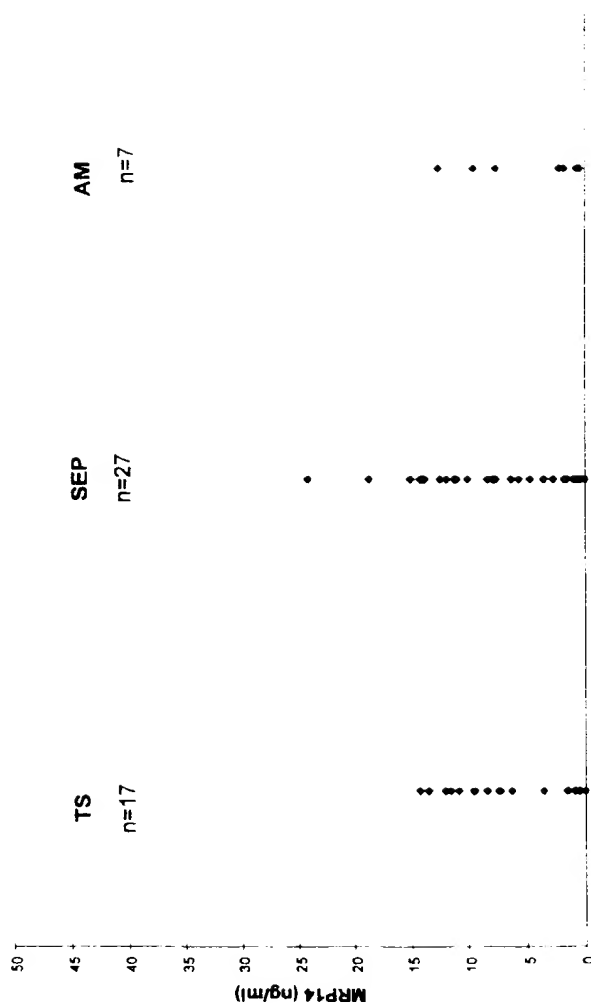


FIG. 5

6/18

Dosage MRP8/14

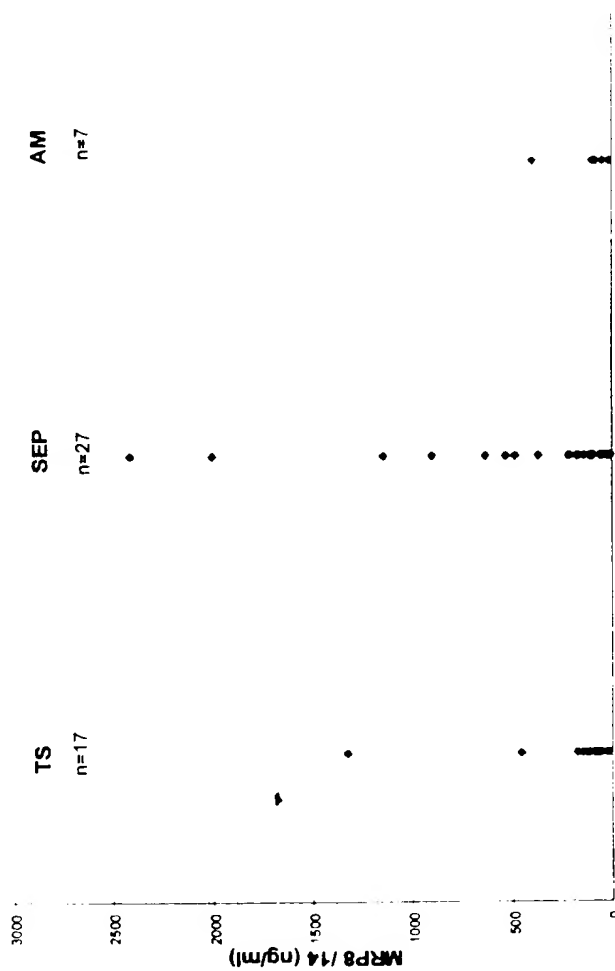


FIG. 6

7/18

Taux urinaire moyen par catégorie de population

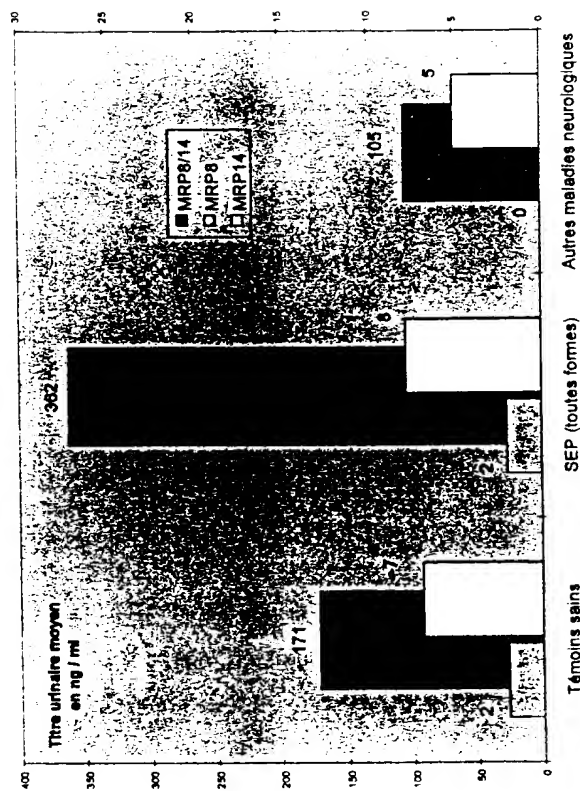
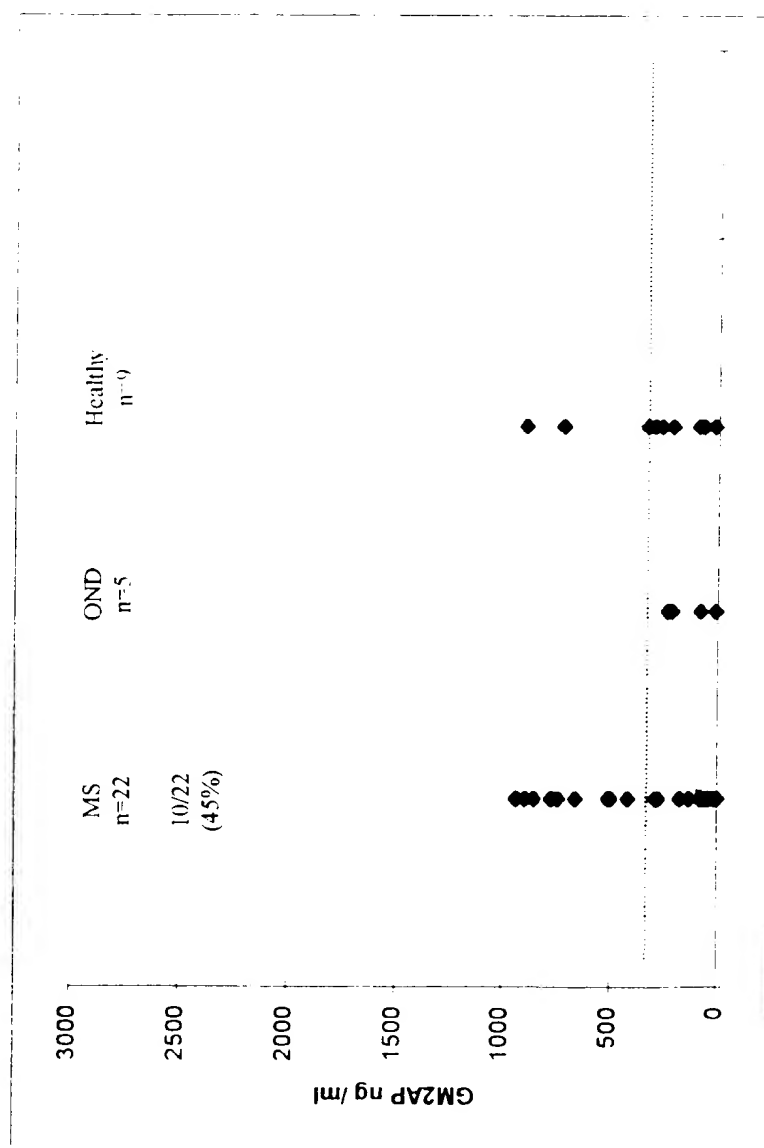


FIG. 7

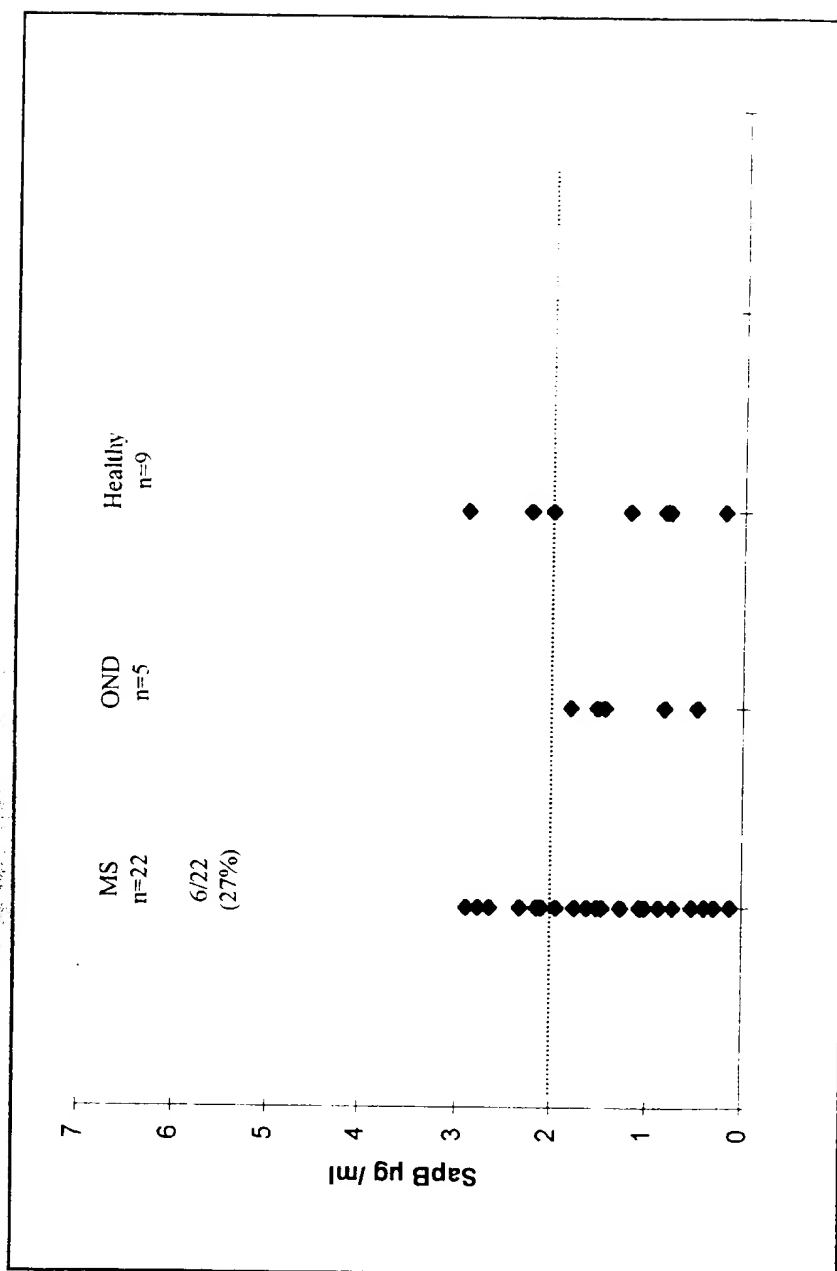
8/18

Figure 8



9/18

Figure 9



10/18

Figure 10

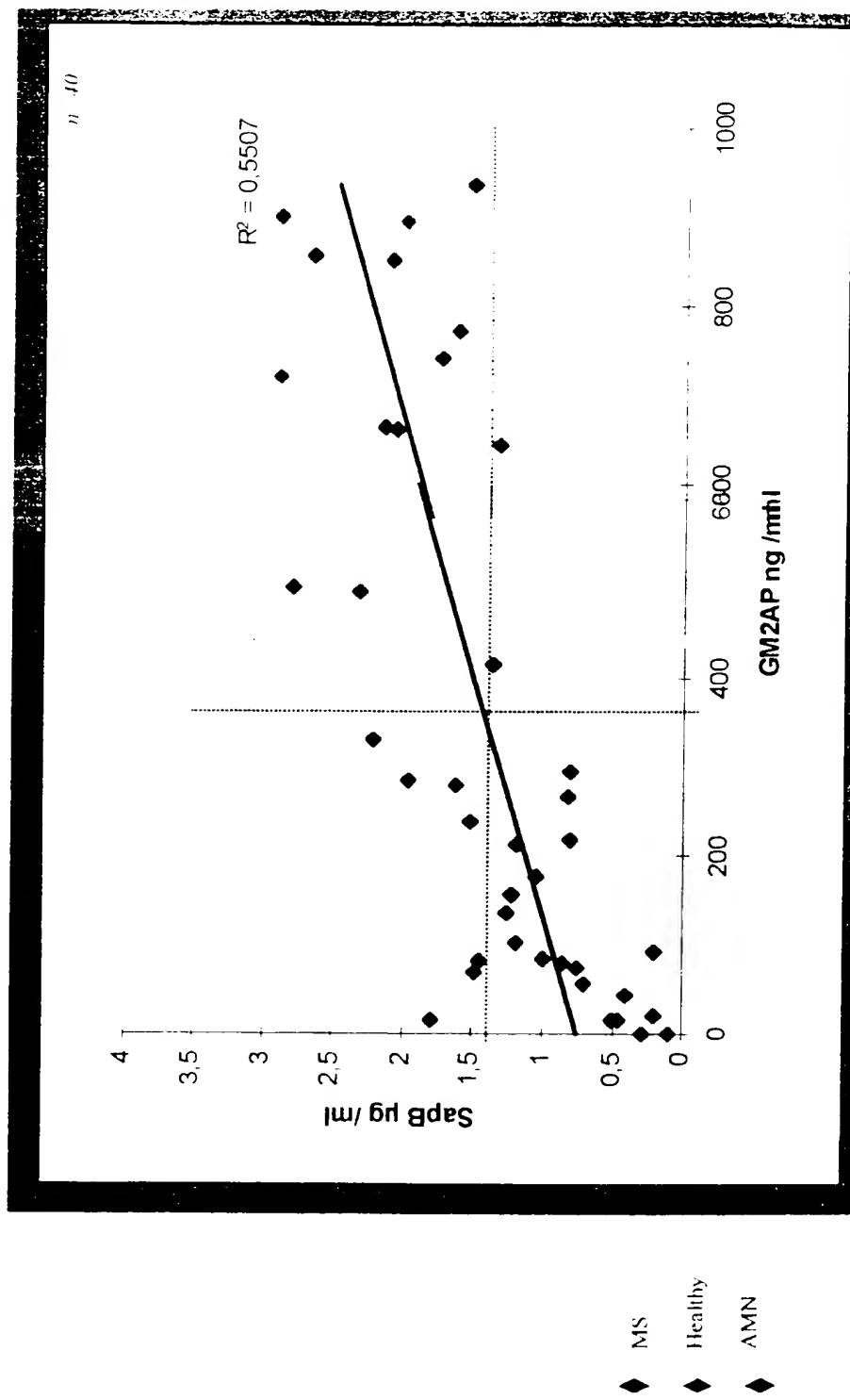
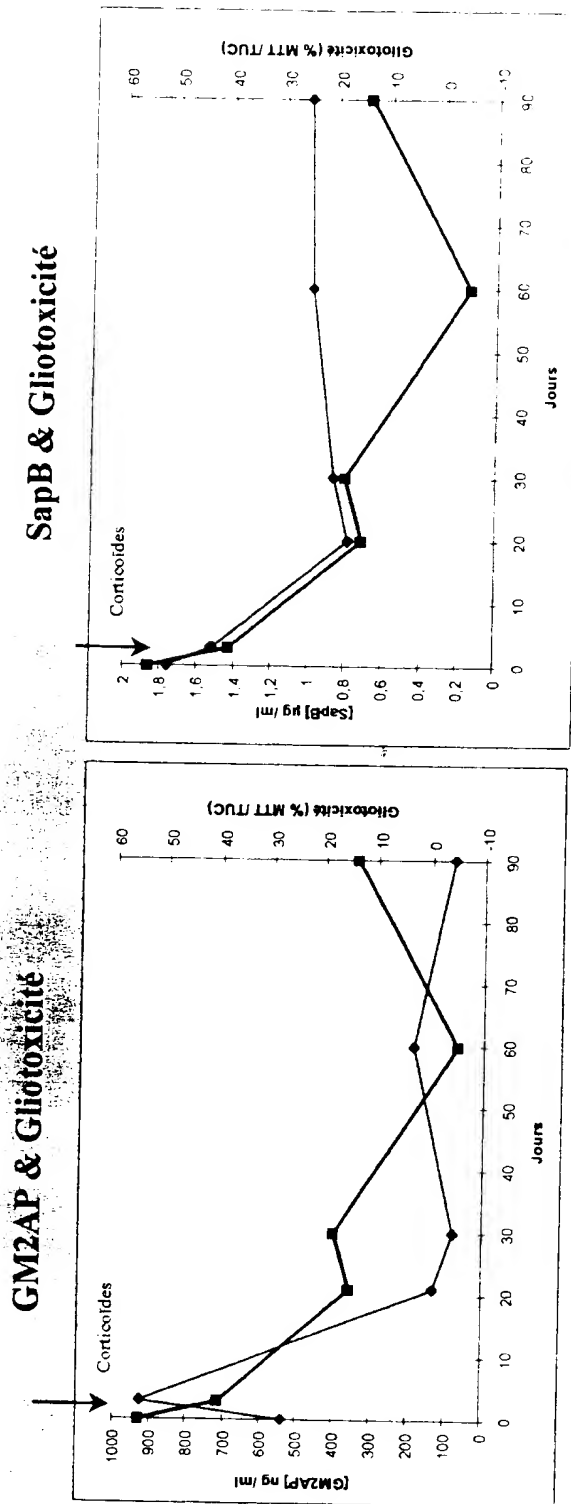


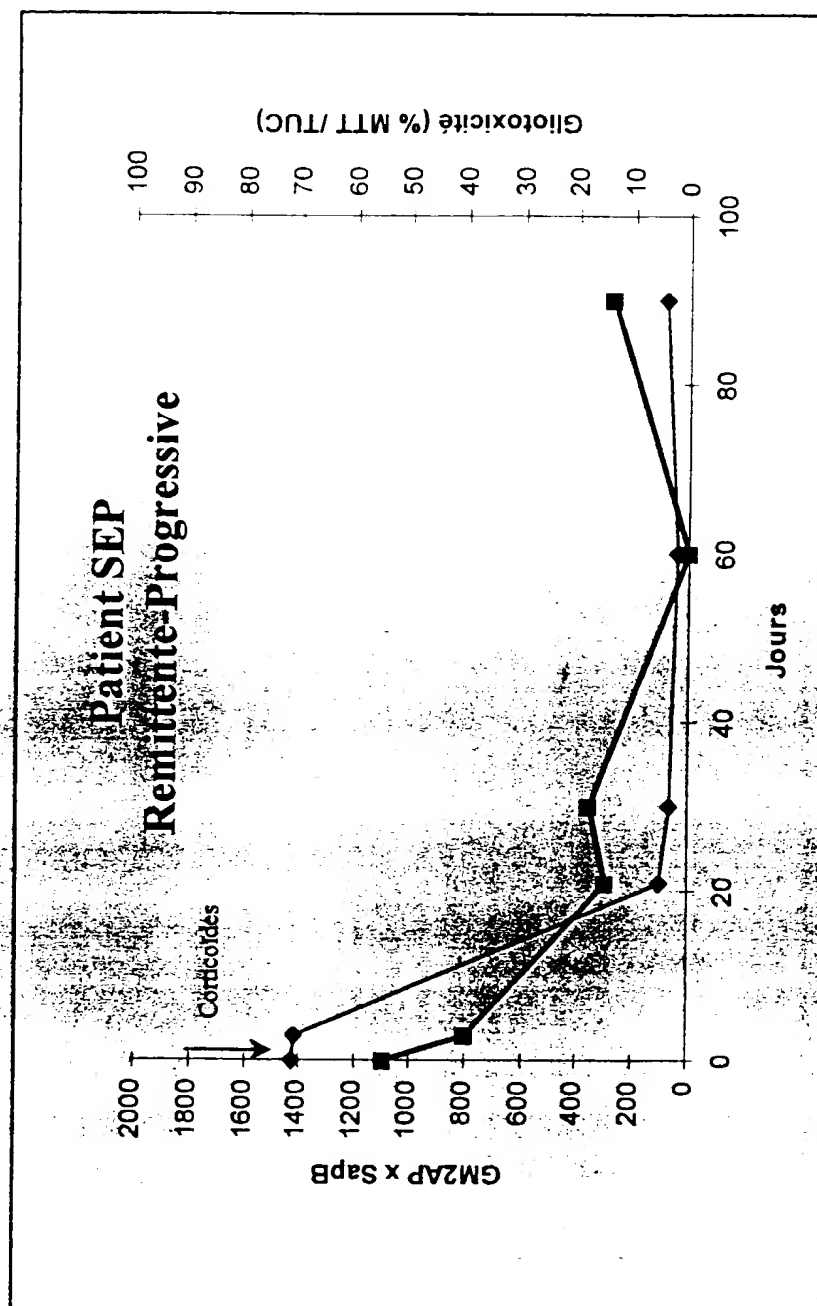
Figure 11

Patient SEP forme Rémittent Progressive



12/18

Figure 12

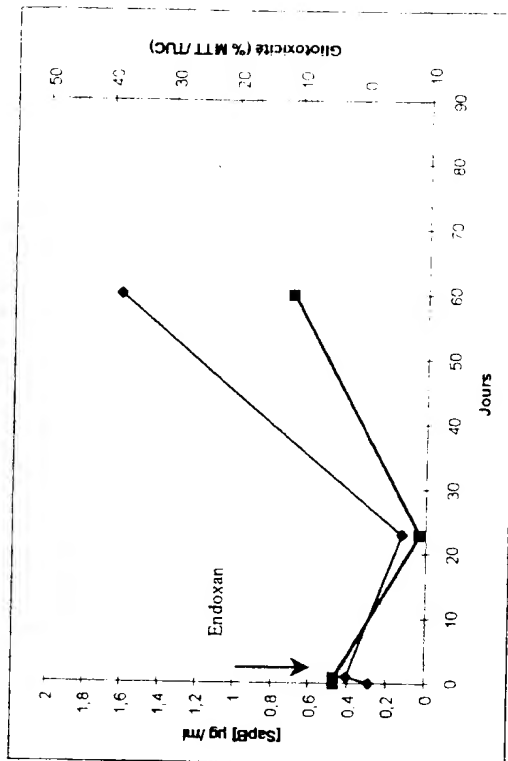


13/18

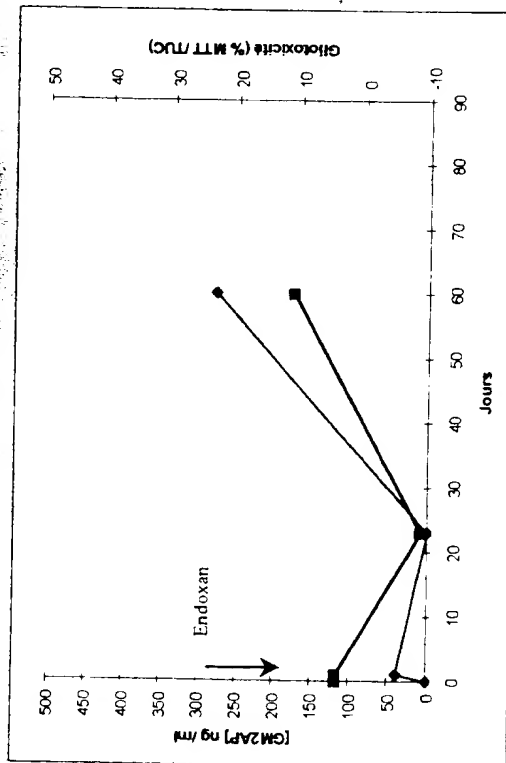
Figure 13

Patient SEP - Progressive

SapB & Gliotoxicité

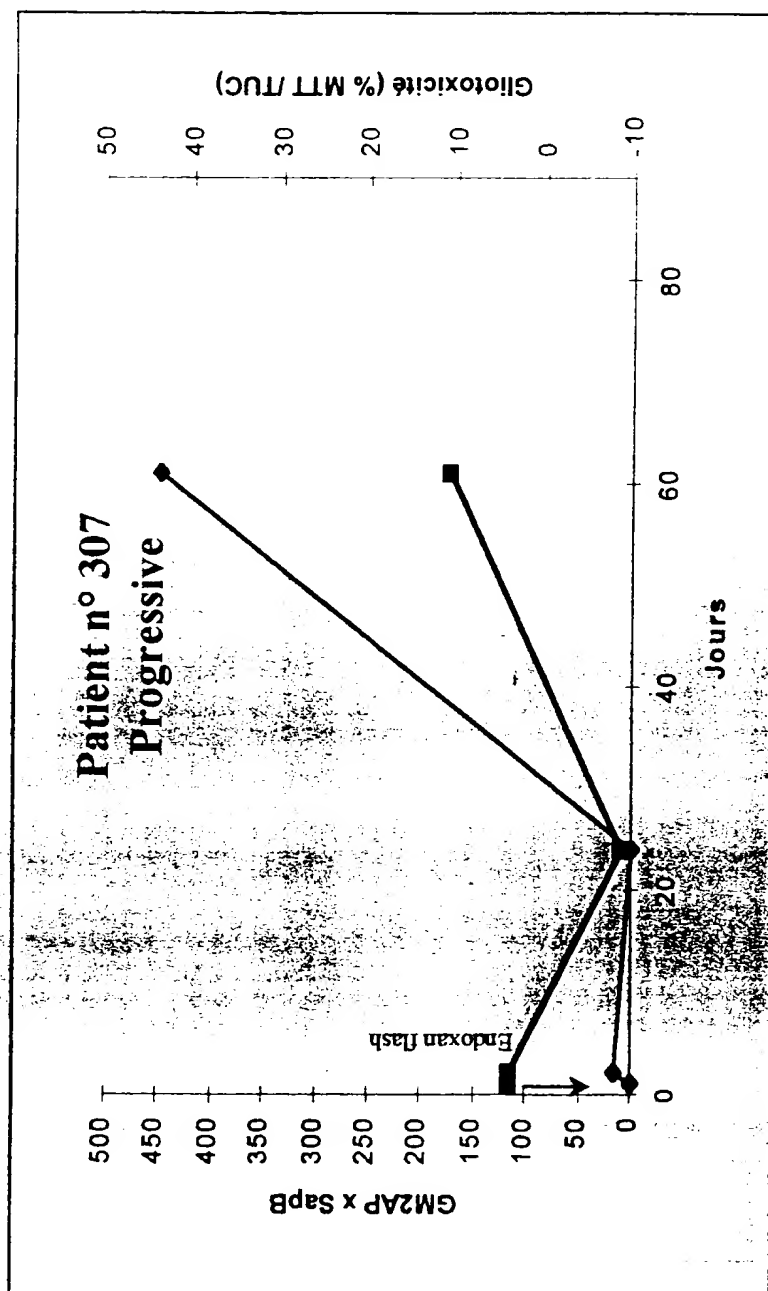


GM2AP & Gliotoxicité



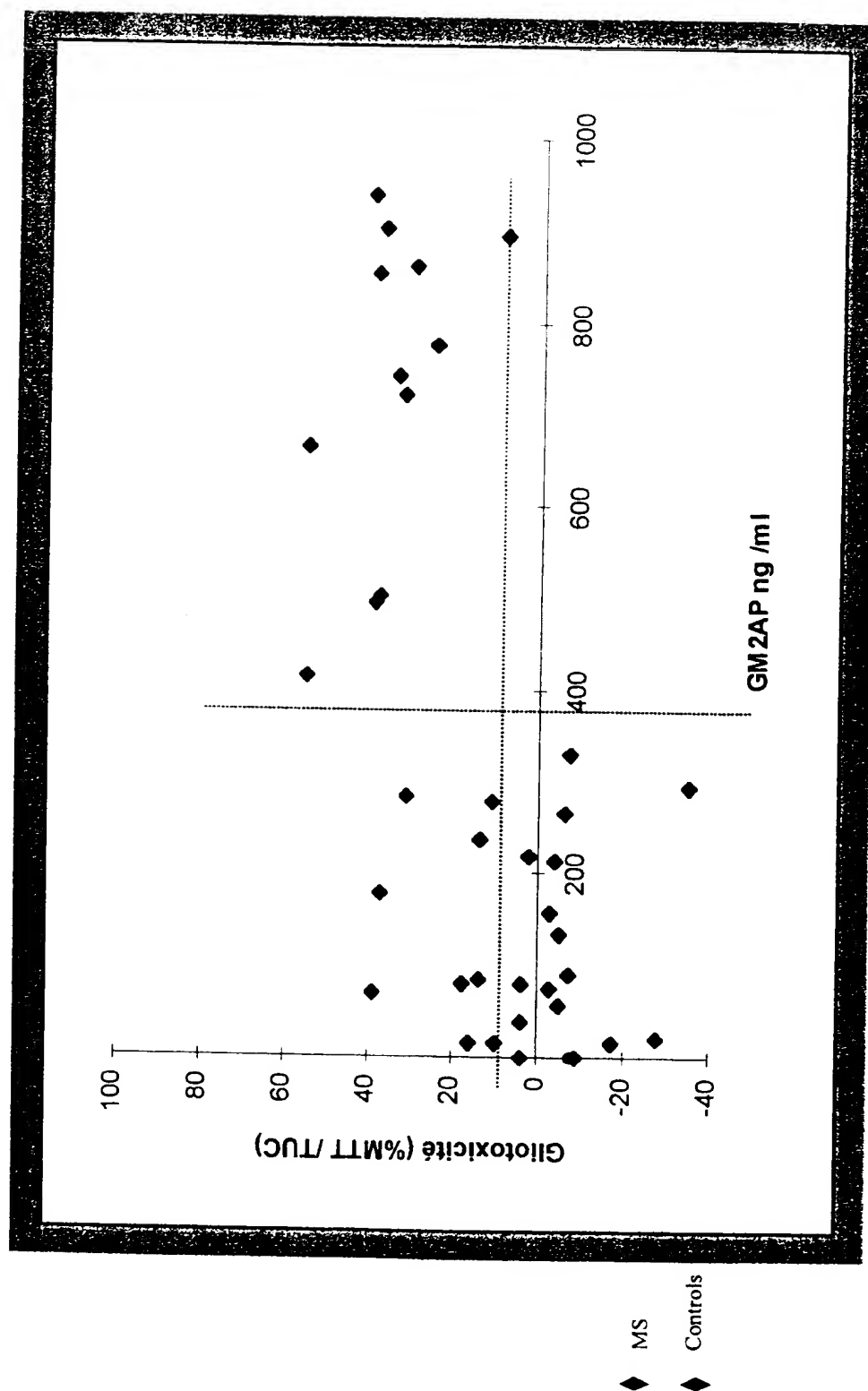
14/18

Figure 14



15/18

Figure 15



16/18

Figure 16

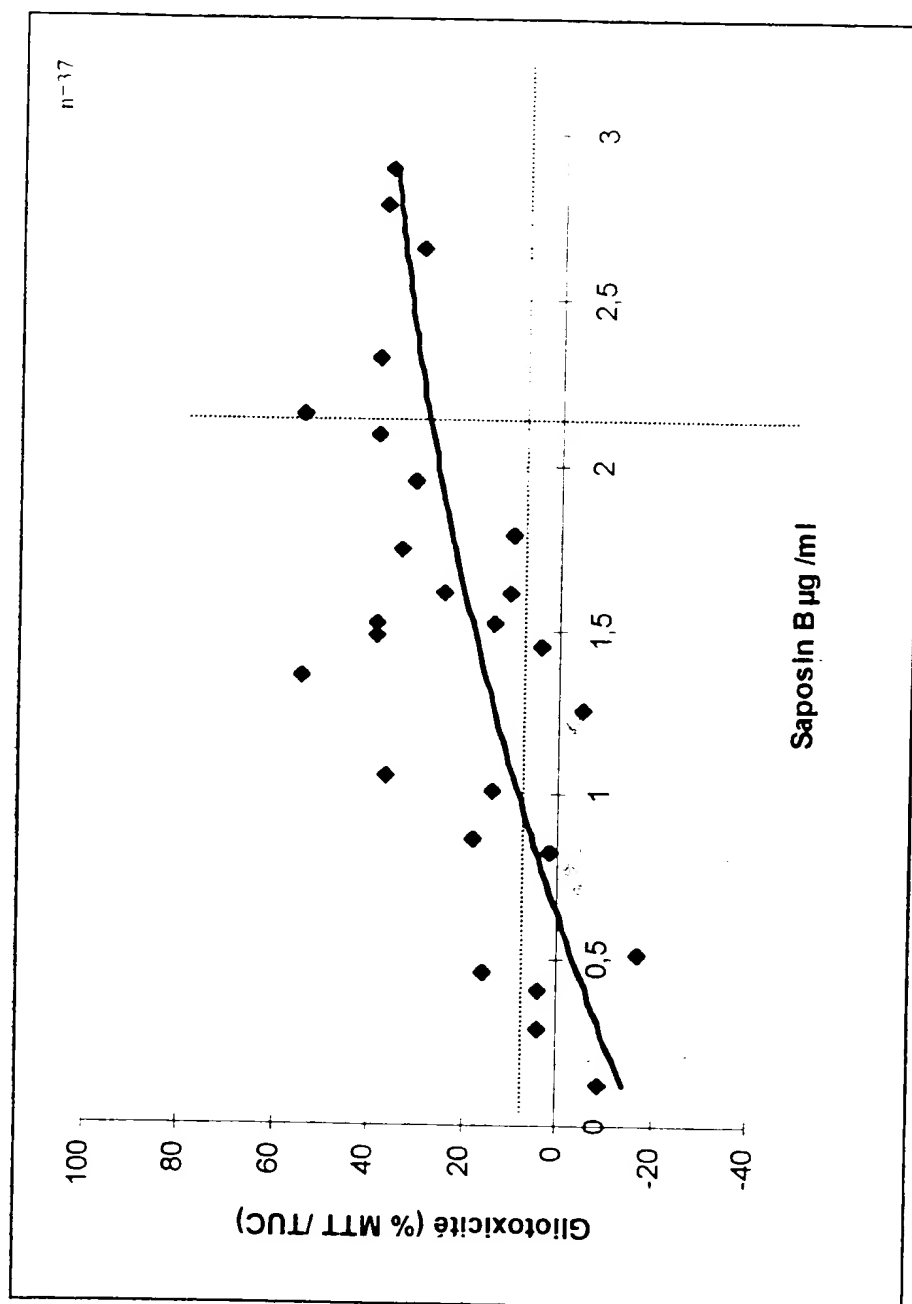
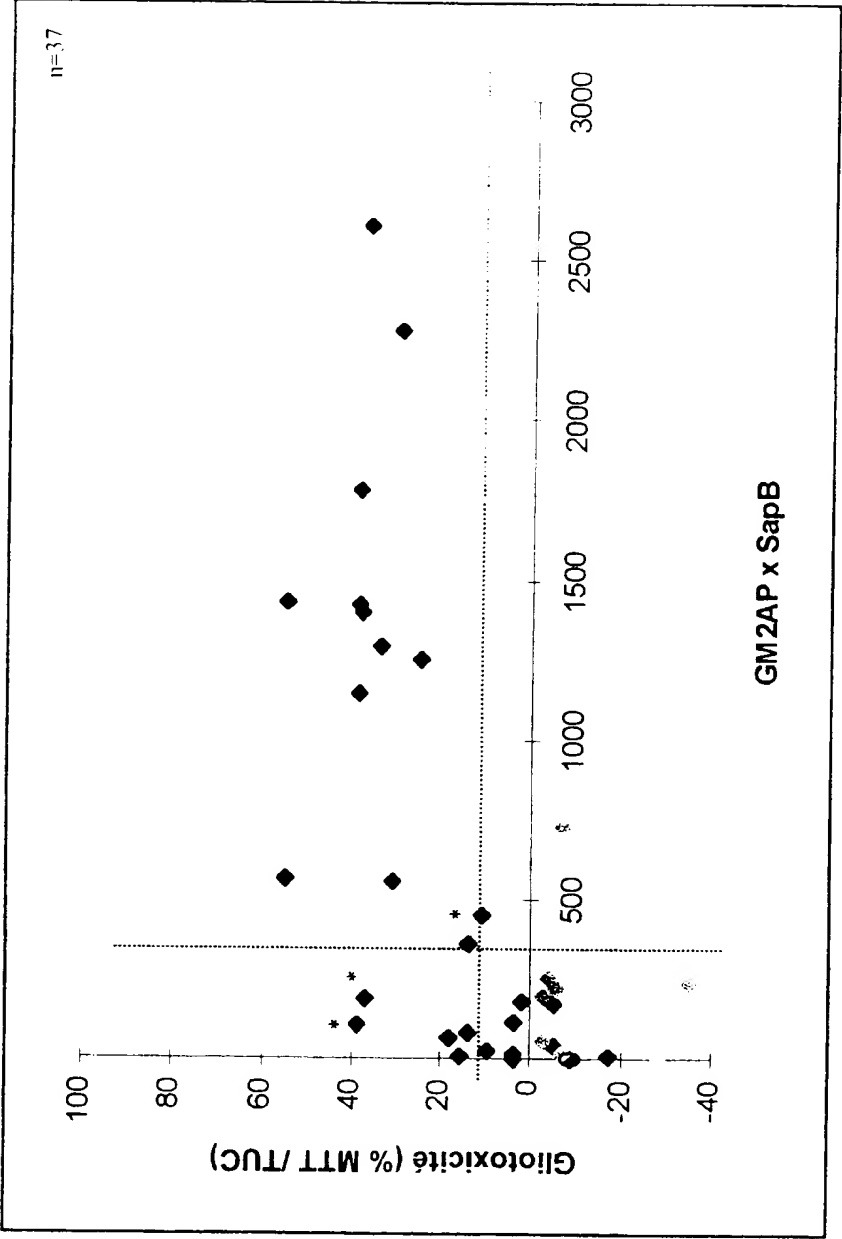
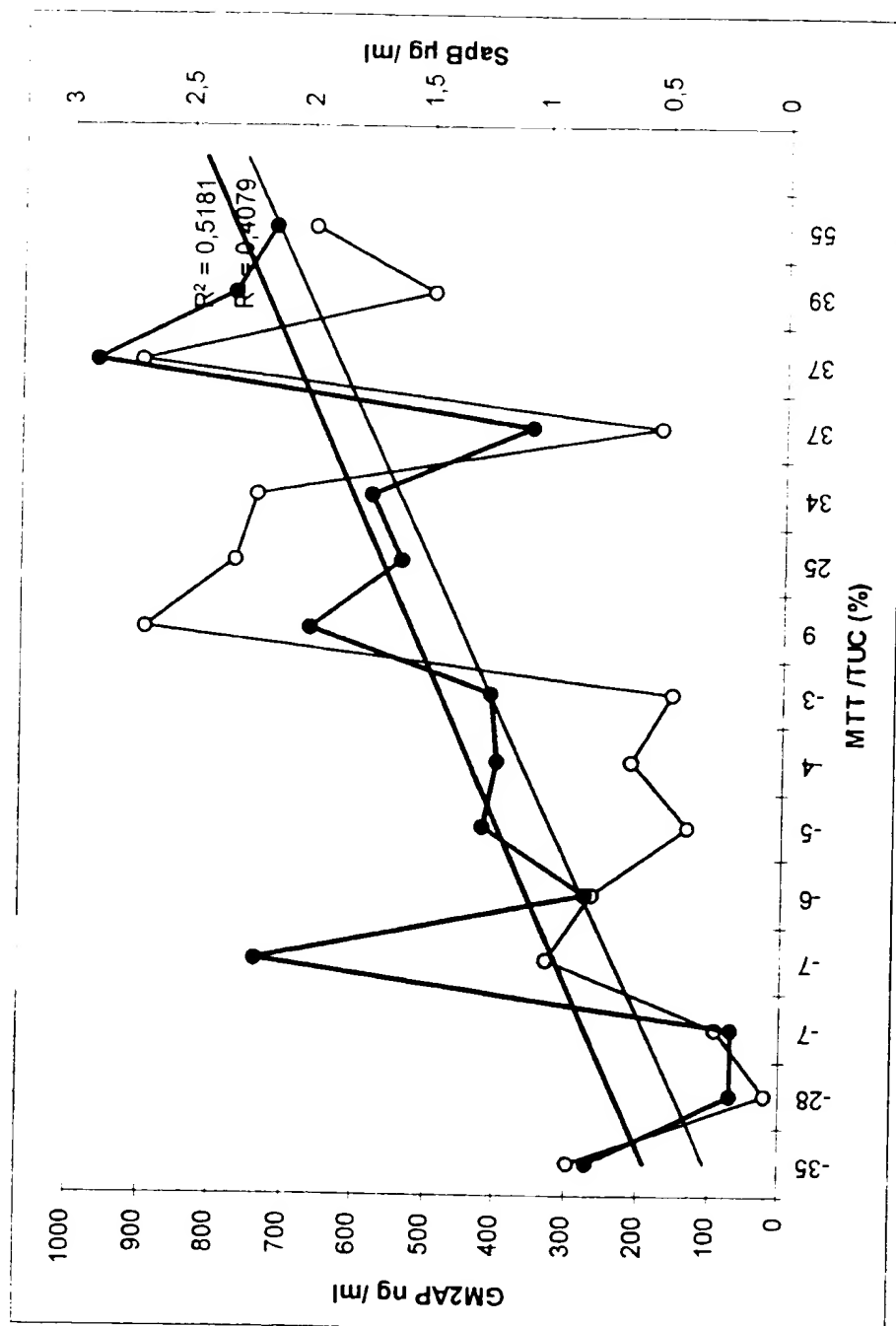


Figure 17



18/18

Figure 18



LISTE DE SEQUENCES

<110> BIOMERIEUX STELHYS

5 <120> Utilisation d'un polypeptide pour détecter, prévenir ou
traiter un état pathologique associé à une maladie
dégénérative, neurologique ou auto-immune

<130> SEP22

10

<140>

<141>

<150> FR9909372

15 <151> 1999-07-15

<160> 75

<170> PatentIn Ver. 2.1

20

<210> 1

<211> 4393

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<400> 1

Met Gly Trp Arg Ala Pro Gly Ala Leu Leu Leu Ala Leu Leu Leu His
1 5 10 15

30 Gly Arg Leu Leu Ala Val Thr His Gly Leu Arg Ala Tyr Asp Gly Leu
20 25 30

Ser Leu Pro Glu Asp Ile Glu Thr Val Thr Ala Ser Gln Met Arg Trp
35 40 45

35

Thr His Ser Tyr Leu Ser Asp Asp Glu Asp Met Leu Ala Asp Ser Ile
50 55 60

40 Ser Gly Asp Asp Leu Gly Ser Gly Asp Leu Gly Ser Gly Asp Phe Gln
65 70 75 80

Met Val Tyr Phe Arg Ala Leu Val Asn Phe Thr Arg Ser Ile Glu Tyr
85 90 95

45 Ser Pro Gln Leu Glu Asp Ala Gly Ser Arg Glu Phe Arg Glu Val Ser
100 105 110

Glu Ala Val Val Asp Thr Leu Glu Ser Glu Tyr Leu Lys Ile Pro Gly
115 120 125

50

Asp Gln Val Val Ser Val Val Phe Ile Lys Glu Leu Asp Gly Trp Val
130 135 140

55 Phe Val Glu Leu Asp Val Gly Ser Glu Gly Asn Ala Asp Gly Ala Gln
145 150 155 160

Ile Gln Glu Met Leu Leu Arg Val Ile Ser Ser Gly Ser Val Ala Ser
165 170 175

Tyr Val Thr Ser Pro Gln Gly Phe Gln Phe Arg Arg Leu Gly Thr Val
 180 185 190
 5 Pro Gln Phe Pro Arg Ala Cys Thr Glu Ala Glu Phe Ala Cys His Ser
 195 200 205
 Tyr Asn Glu Cys Val Ala Leu Glu Tyr Arg Cys Asp Arg Arg Pro Asp
 210 215 220
 10 Cys Arg Asp Met Ser Asp Glu Leu Asn Cys Glu Glu Pro Val Leu Gly
 225 230 235 240
 Ile Ser Pro Thr Phe Ser Leu Leu Val Glu Thr Thr Ser Leu Pro Pro
 15 245 250 255
 Arg Pro Glu Thr Thr Ile Met Arg Gln Pro Pro Val Thr His Ala Pro
 260 265 270
 20 Gln Pro Leu Leu Pro Gly Ser Val Arg Pro Leu Pro Cys Gly Pro Gln
 275 280 285
 Glu Ala Ala Cys Arg Asn Gly His Cys Ile Pro Arg Asp Tyr Leu Cys
 290 295 300
 25 Asp Gly Gln Glu Asp Cys Glu Asp Gly Ser Asp Glu Leu Asp Cys Gly
 305 310 315 320
 Pro Pro Pro Pro Cys Glu Pro Asn Glu Phe Pro Cys Gly Asn Gly His
 30 325 330 335
 Cys Ala Leu Lys Leu Trp Arg Cys Asp Gly Asp Phe Asp Cys Glu Asp
 340 345 350
 35 Arg Thr Asp Glu Ala Asn Cys Pro Thr Lys Arg Pro Glu Glu Val Cys
 355 360 365
 Gly Pro Thr Gln Phe Arg Cys Val Ser Thr Asn Met Cys Ile Pro Ala
 370 375 380
 40 Ser Phe His Cys Asp Glu Glu Ser Asp Cys Pro Asp Arg Ser Asp Glu
 385 390 395 400
 Phe Gly Cys Met Pro Pro Gln Val Val Thr Pro Pro Arg Glu Ser Ile
 45 405 410 415
 Gln Ala Ser Arg Gly Gln Thr Val Thr Phe Thr Cys Val Ala Ile Gly
 420 425 430
 50 Val Pro Ala Pro Phe Leu Ile Asn Trp Arg Leu Asn Trp Gly His Ile
 435 440 445
 Pro Ser Gln Pro Arg Val Thr Val Thr Ser Glu Gly Gly Arg Gly Thr
 450 455 460
 55 Leu Ile Ile Arg Asp Val Lys Glu Ser Asp Gln Gly Ala Tyr Thr Cys
 465 470 475 480

Glu Ala Met Asn Ala Arg Gly Met Val Phe Gly Ile Pro Asp Gly Val
 485 490 495
 5 Leu Glu Leu Val Pro Gln Arg Ala Gly Pro Cys Pro Asp Gly His Phe
 500 505 510
 Tyr Leu Glu His Ser Ala Ala Cys Leu Pro Cys Phe Cys Phe Gly Ile
 515 520 525
 10 Thr Ser Val Cys Gln Ser Thr Arg Arg Phe Arg Asp Gln Ile Arg Leu
 530 535 540
 Arg Phe Asp Gln Pro Asp Asp Phe Lys Gly Val Asn Val Thr Met Pro
 545 550 555 560
 15 Ala Gln Pro Gly Thr Pro Pro Leu Ser Ser Thr Gln Leu Gln Ile Asp
 565 570 575
 Pro Ser Leu His Glu Phe Gln Leu Val Asp Leu Ser Arg Arg Phe Leu
 580 585 590
 Val His Asp Ser Phe Trp Ala Leu Pro Glu Gln Phe Leu Gly Asn Lys
 595 600 605
 25 Val Asp Ser Tyr Gly Gly Ser Leu Arg Tyr Asn Val Arg Tyr Glu Leu
 610 615 620
 Ala Arg Gly Met Leu Glu Pro Val Gln Arg Pro Asp Val Val Leu Val
 625 630 635 640
 30 Gly Ala Gly Tyr Arg Leu Leu Ser Arg Gly His Thr Pro Thr Gln Pro
 645 650 655
 Gly Ala Leu Asn Gln Arg Gln Val Gln Phe Ser Glu Glu His Trp Val
 660 665 670
 35 His Glu Ser Gly Arg Pro Val Gln Arg Ala Glu Leu Leu Gln Val Leu
 675 680 685
 Gln Ser Leu Glu Ala Val Leu Ile Gln Thr Val Tyr Asn Thr Lys Met
 690 695 700
 Ala Ser Val Gly Leu Ser Asp Ile Ala Met Asp Thr Thr Val Thr His
 705 710 715 720
 45 Ala Thr Ser His Gly Arg Ala His Ser Val Glu Glu Cys Arg Cys Pro
 725 730 735
 Ile Gly Tyr Ser Gly Leu Ser Cys Glu Ser Cys Asp Ala His Phe Thr
 740 745 750
 50 Arg Val Pro Gly Gly Pro Tyr Leu Gly Thr Cys Ser Gly Cys Ser Cys
 755 760 765
 55 Asn Gly His Ala Ser Ser Cys Asp Pro Val Tyr Gly His Cys Leu Asn
 770 775 780
 Cys Gln His Asn Thr Glu Gly Pro Gln Cys Lys Lys Cys Lys Ala Gly

785 790 795 800
 Phe Phe Gly Asp Ala Met Lys Ala Thr Ala Thr Ser Cys Arg Pro Cys
 805 810 815
 5 Pro Cys Pro Tyr Ile Asp Ala Ser Arg Arg Phe Ser Asp Thr Cys Phe
 820 825 830
 10 Leu Asp Thr Asp Gly Gln Ala Thr Cys Asp Ala Cys Ala Pro Gly Tyr
 835 840 845
 Thr Gly Arg Arg Cys Glu Ser Cys Ala Pro Gly Tyr Glu Gly Asn Pro
 850 855 860
 15 Ile Gln Pro Gly Gly Lys Cys Arg Pro Val Asn Gln Glu Ile Val Arg
 865 870 875 880
 Cys Asp Glu Arg Gly Ser Met Gly Thr Ser Gly Glu Ala Cys Arg Cys
 885 890 895
 20 Lys Asn Asn Val Val Gly Arg Leu Cys Asn Glu Cys Ala Asp Arg Ser
 900 905 910
 25 Phe His Leu Ser Thr Arg Asn Pro Asp Gly Cys Leu Lys Cys Phe Cys
 915 920 925
 Met Gly Val Ser Arg His Cys Thr Ser Ser Ser Trp Ser Arg Ala Gln
 930 935 940
 30 Leu His Gly Ala Ser Glu Glu Pro Gly His Phe Ser Leu Thr Asn Ala
 945 950 955 960
 Ala Ser Thr His Thr Thr Asn Glu Gly Ile Phe Ser Pro Thr Pro Gly
 965 970 975
 35 Glu Leu Gly Phe Ser Ser Phe His Arg Leu Leu Ser Gly Pro Tyr Phe
 980 985 990
 40 Trp Ser Leu Pro Ser Arg Phe Leu Gly Asp Lys Val Thr Ser Tyr Gly
 995 1000 1005
 Gly Glu Leu Arg Phe Thr Val Thr Gln Arg Ser Gln Pro Gly Ser Thr
 1010 1015 1020
 45 Pro Leu His Gly Gln Pro Leu Val Val Leu Gln Gly Asn Asn Ile Ile
 1025 1030 1035 1040
 Leu Glu His His Val Ala Gln Glu Pro Ser Pro Gly Gln Pro Ser Thr
 1045 1050 1055
 50 Phe Ile Val Pro Phe Arg Glu Gln Ala Trp Gln Arg Pro Asp Gly Gln
 1060 1065 1070
 Pro Ala Thr Arg Glu His Leu Leu Met Ala Leu Ala Gly Ile Asp Thr
 1075 1080 1085
 55 Leu Leu Ile Arg Ala Ser Tyr Ala Gln Gln Pro Ala Glu Ser Arg Val
 1090 1095 1100

Ser Gly Ile Ser Met Asp Val Ala Val Pro Glu Glu Thr Gly Gln Asp
 1105 1110 1115 1120

5 Pro Ala Leu Glu Val Glu Gln Cys Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Arg Gly
 1125 1130 1135

Pro Ser Cys Gln Asp Cys Asp Thr Gly Tyr Thr Arg Thr Pro Ser Gly
 1140 1145 1150

10 Leu Tyr Leu Gly Thr Cys Glu Arg Cys Ser Cys His Gly His Ser Glu
 1155 1160 1165

Ala Cys Glu Pro Glu Thr Gly Ala Cys Gln Gly Cys Gln His His Thr
 15 1170 1175 1180

Glu Gly Pro Arg Cys Glu Gln Cys Gln Pro Gly Tyr Tyr Gly Asp Ala
 1185 1190 1195 1200

20 Gln Arg Gly Thr Pro Gln Asp Cys Gln Leu Cys Pro Cys Tyr Gly Asp
 1205 1210 1215

Pro Ala Ala Gly Gln Ala Ala His Thr Cys Phe Leu Asp Thr Asp Gly
 1220 1225 1230

25 His Pro Thr Cys Asp Ala Cys Ser Pro Gly His Ser Gly Arg His Cys
 1235 1240 1245

Glu Arg Cys Ala Pro Gly Tyr Tyr Gly Asn Pro Ser Gln Gly Gln Pro
 30 1250 1255 1260

Cys Gln Arg Asp Ser Gln Val Pro Gly Pro Ile Gly Cys Asn Cys Asp
 1265 1270 1275 1280

35 Pro Gln Gly Ser Val Ser Ser Gln Cys Asp Ala Ala Gly Gln Cys Gln
 1285 1290 1295

Cys Lys Ala Gln Val Glu Gly Leu Thr Cys Ser His Cys Arg Pro His
 40 1300 1305 1310

His Phe His Leu Ser Ala Ser Asn Pro Asp Gly Cys Leu Pro Cys Phe
 1315 1320 1325

Cys Met Gly Ile Thr Gln Gln Cys Ala Ser Ser Ala Tyr Thr Arg His
 45 1330 1335 1340

Leu Ile Ser Thr His Phe Ala Pro Gly Asp Phe Gln Gly Phe Ala Leu
 1345 1350 1355 1360

50 Val Asn Pro Gln Arg Asn Ser Arg Leu Thr Gly Glu Phe Thr Val Glu
 1365 1370 1375

Pro Val Pro Glu Gly Ala Gln Leu Ser Phe Gly Asn Phe Ala Gln Leu
 1380 1385 1390

55 Gly His Glu Ser Phe Tyr Trp Gln Leu Pro Glu Thr Tyr Gln Gly Asp
 1395 1400 1405

Lys Val Ala Ala Tyr Gly Gly Lys Leu Arg Tyr Thr Leu Ser Tyr Thr
 1410 1415 1420
 Ala Gly Pro Gln Gly Ser Pro Leu Ser Asp Pro Asp Val Gln Ile Thr
 1425 1430 1435 1440
 Gly Asn Asn Ile Met Leu Val Ala Ser Gln Pro Ala Leu Gln Gly Pro
 1445 1450 1455
 10 Glu Arg Arg Ser Tyr Glu Ile Met Phe Arg Glu Glu Phe Trp Arg Arg
 1460 1465 1470
 Pro Asp Gly Gln Pro Ala Thr Arg Glu His Leu Leu Met Ala Leu Ala
 1475 1480 1485
 15 Asp Leu Asp Glu Leu Leu Ile Arg Ala Thr Phe Ser Ser Val Pro Leu
 1490 1495 1500
 Val Ala Ser Ile Ser Ala Val Ser Leu Glu Val Ala Gln Pro Gly Pro
 20 1505 1510 1515 1520
 Ser Asn Arg Pro Arg Ala Leu Glu Val Glu Glu Cys Arg Cys Pro Pro
 1525 1530 1535
 25 Gly Tyr Ile Gly Leu Ser Cys Gln Asp Cys Ala Pro Gly Tyr Thr Arg
 1540 1545 1550
 Thr Gly Ser Gly Leu Tyr Leu Gly His Cys Glu Leu Cys Glu Cys Asn
 1555 1560 1565
 30 Gly His Ser Asp Leu Cys His Pro Glu Thr Gly Ala Cys Ser Gln Cys
 1570 1575 1580
 Gln His Asn Ala Ala Gly Glu Phe Cys Glu Leu Cys Ala Pro Gly Tyr
 35 1585 1590 1595 1600
 Tyr Gly Asp Ala Thr Ala Gly Thr Pro Glu Asp Cys Gln Pro Cys Ala
 1605 1610 1615
 40 Cys Pro Leu Thr Asn Pro Glu Asn Met Phe Ser Arg Thr Cys Glu Ser
 1620 1625 1630
 Leu Gly Ala Gly Gly Tyr Arg Cys Thr Ala Cys Glu Pro Gly Tyr Thr
 1635 1640 1645
 45 Gly Gln Tyr Cys Glu Gln Cys Gly Pro Gly Tyr Val Gly Asn Pro Ser
 1650 1655 1660
 Val Gln Gly Gly Gln Cys Leu Pro Glu Thr Asn Gln Ala Pro Leu Val
 50 1665 1670 1675 1680
 Val Glu Val His Pro Ala Arg Ser Ile Val Pro Gln Gly Gly Ser His
 1685 1690 1695
 55 Ser Leu Arg Cys Gln Val Ser Gly Arg Gly Pro His Tyr Phe Tyr Trp
 1700 1705 1710
 Ser Arg Glu Asp Gly Arg Pro Val Pro Ser Gly Thr Gln Gln Arg His

| | 1715 | 1720 | 1725 |
|----|---|------|-----------|
| | Gln Gly Ser Glu Leu His Phe Pro Ser Val Gln Pro Ser Asp Ala Gly | | |
| | 1730 | 1735 | 1740 |
| 5 | Val Tyr Ile Cys Thr Cys Arg Asn Leu His Arg Ser Asn Thr Ser Arg | | |
| | 1745 | 1750 | 1755 1760 |
| | Ala Glu Leu Leu Val Thr Glu Ala Pro Ser Lys Pro Ile Thr Val Thr | | |
| 10 | 1765 | 1770 | 1775 |
| | Val Glu Glu Gln Arg Ser Gln Ser Val Arg Pro Gly Ala Asp Val Thr | | |
| | 1780 | 1785 | 1790 |
| 15 | Phe Ile Cys Thr Ala Lys Ser Lys Ser Pro Ala Tyr Thr Leu Val Trp | | |
| | 1795 | 1800 | 1805 |
| | Thr Arg Leu His Asn Gly Lys Leu Pro Thr Arg Ala Met Asp Phe Asn | | |
| 20 | 1810 | 1815 | 1820 |
| | Gly Ile Leu Thr Ile Arg Asn Val Gln Leu Ser Asp Ala Gly Thr Tyr | | |
| | 1825 | 1830 | 1835 1840 |
| | Val Cys Thr Gly Ser Asn Met Phe Ala Met Asp Gln Gly Thr Ala Thr | | |
| 25 | 1845 | 1850 | 1855 |
| | Leu His Val Gln Ala Ser Gly Thr Leu Ser Ala Pro Val Val Ser Ile | | |
| | 1860 | 1865 | 1870 |
| 30 | His Pro Pro Gln Leu Thr Val Gln Pro Gly Gln Leu Ala Glu Phe Arg | | |
| | 1875 | 1880 | 1885 |
| | Cys Ser Ala Thr Gly Ser Pro Thr Pro Thr Leu Glu Trp Thr Gly Gly | | |
| | 1890 | 1895 | 1900 |
| 35 | Pro Gly Gly Gln Leu Pro Ala Lys Ala Gln Ile His Gly Gly Ile Leu | | |
| | 1905 | 1910 | 1915 1920 |
| | Arg Leu Pro Ala Val Glu Pro Thr Asp Gln Ala Gln Tyr Leu Cys Arg | | |
| 40 | 1925 | 1930 | 1935 |
| | Ala His Ser Ser Ala Gly Gln Gln Val Ala Arg Ala Val Leu His Val | | |
| | 1940 | 1945 | 1950 |
| 45 | His Gly Gly Gly Gly Pro Arg Val Gln Val Ser Pro Glu Arg Thr Gln | | |
| | 1955 | 1960 | 1965 |
| | Val His Ala Gly Arg Thr Val Arg Leu Tyr Cys Arg Ala Ala Gly Val | | |
| 50 | 1970 | 1975 | 1980 |
| | Pro Ser Ala Thr Ile Thr Trp Arg Lys Glu Gly Gly Ser Leu Pro Pro | | |
| | 1985 | 1990 | 1995 2000 |
| | Gln Ala Arg Ser Glu Arg Thr Asp Ile Ala Thr Leu Leu Ile Pro Ala | | |
| 55 | 2005 | 2010 | 2015 |
| | Ile Thr Thr Ala Asp Ala Gly Phe Tyr Leu Cys Val Ala Thr Ser Pro | | |
| | 2020 | 2025 | 2030 |

Ala Gly Thr Ala Gln Ala Arg Ile Gln Val Val Val Leu Ser Ala Ser
 2035 2040 2045

5 Asp Ala Ser Gln Pro Pro Val Lys Ile Glu Ser Ser Ser Pro Ser Val
 2050 2055 2060

Thr Glu Gly Gln Thr Leu Asp Leu Asn Cys Val Val Ala Gly Ser Ala
 2065 2070 2075 2080

10 His Ala Gln Val Thr Trp Tyr Arg Arg Gly Gly Ser Leu Pro His His
 2085 2090 2095

Thr Gln Val His Gly Ser Arg Leu Arg Leu Pro Gln Val Ser Pro Ala
 15 2100 2105 2110

Asp Ser Gly Glu Tyr Val Cys Arg Val Glu Asn Gly Ser Gly Pro Lys
 2115 2120 2125

20 Glu Ala Ser Ile Thr Val Ser Val Leu His Gly Thr His Ser Gly Pro
 2130 2135 2140

Ser Tyr Thr Pro Val Pro Gly Ser Thr Arg Pro Ile Arg Ile Glu Pro
 2145 2150 2155 2160

25 Ser Ser Ser His Val Ala Glu Gly Gln Thr Leu Asp Leu Asn Cys Val
 2165 2170 2175

Val Pro Gly Gln Ala His Ala Gln Val Thr Trp His Lys Arg Gly Gly
 30 2180 2185 2190

Ser Leu Pro Ala Arg His Gln Thr His Gly Ser Leu Leu Arg Leu His
 2195 2200 2205

35 Gln Val Thr Pro Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Val Cys His Val Val Gly
 2210 2215 2220

Thr Ser Gly Pro Leu Glu Ala Ser Val Leu Val Thr Ile Glu Ala Ser
 2225 2230 2235 2240

40 Val Ile Pro Gly Pro Ile Pro Pro Val Arg Ile Glu Ser Ser Ser Ser
 2245 2250 2255

Thr Val Ala Glu Gly Gln Thr Leu Asp Leu Ser Cys Val Val Ala Gly
 45 2260 2265 2270

Gln Ala His Ala Gln Val Thr Trp Tyr Lys Arg Gly Gly Ser Leu Pro
 2275 2280 2285

50 Ala Arg His Gln Val Arg Gly Ser Arg Leu Tyr Ile Phe Gln Ala Ser
 2290 2295 2300

Pro Ala Asp Ala Gly Gln Tyr Val Cys Arg Ala Ser Asn Gly Met Glu
 2305 2310 2315 2320

55 Ala Ser Ile Thr Val Thr Val Thr Gly Thr Gln Gly Ala Asn Leu Ala
 2325 2330 2335

Tyr Pro Ala Gly Ser Thr Gln Pro Ile Arg Ile Glu Pro Ser Ser Ser
 2340 2345 2350

5 Gln Val Ala Glu Gly Gln Thr Leu Asp Leu Asn Cys Val Val Pro Gly
 2355 2360 2365

Gln Ser His Ala Gln Val Thr Trp His Lys Arg Gly Gly Ser Leu Pro
 2370 2375 2380

10 Val Arg His Gln Thr His Gly Ser Leu Leu Arg Leu Tyr Gln Ala Ser
 2385 2390 2395 2400

Pro Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Val Cys Arg Val Leu Gly Ser Ser Val
 2405 2410 2415

15 Pro Leu Glu Ala Ser Val Leu Val Thr Ile Glu Pro Ala Gly Ser Val
 2420 2425 2430

20 Pro Ala Leu Gly Val Thr Pro Thr Val Arg Ile Glu Ser Ser Ser Ser
 2435 2440 2445

Gln Val Ala Glu Gly Gln Thr Leu Asp Leu Asn Cys Leu Val Ala Gly
 2450 2455 2460

25 Gln Ala His Ala Gln Val Thr Trp His Lys Arg Gly Gly Ser Leu Pro
 2465 2470 2475 2480

Ala Arg His Gln Val His Gly Ser Arg Leu Arg Leu Leu Gln Val Thr
 2485 2490 2495

30 Pro Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Val Cys Arg Val Val Gly Ser Ser Gly
 2500 2505 2510

35 Thr Gln Glu Ala Ser Val Leu Val Thr Ile Gln Gln Arg Leu Ser Gly
 2515 2520 2525

Ser His Ser Gln Gly Val Ala Tyr Pro Val Arg Ile Glu Ser Ser Ser
 2530 2535 2540

40 Ala Ser Leu Ala Asn Gly His Thr Leu Asp Leu Asn Cys Leu Val Ala
 2545 2550 2555 2560

Ser Gln Ala Pro His Thr Ile Thr Trp Tyr Lys Arg Gly Gly Ser Leu
 2565 2570 2575

45 Pro Ser Arg His Gln Ile Val Gly Ser Arg Leu Arg Ile Pro Gln Val
 2580 2585 2590

50 Thr Pro Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Val Cys His Val Ser Asn Gly Ala
 2595 2600 2605

Gly Ser Arg Glu Thr Ser Leu Ile Val Thr Ile Gln Gly Ser Gly Ser
 2610 2615 2620

55 Ser His Val Pro Arg Val Ser Pro Pro Ile Arg Ile Glu Ser Ser Ser
 2625 2630 2635 2640

Pro Thr Val Val Glu Gly Gln Thr Leu Asp Leu Asn Cys Val Val Ala

| | | | |
|----|---|------|------|
| | 2645 | 2650 | 2655 |
| | Arg Gln Pro Gln Ala Ile Ile Thr Trp Tyr Lys Arg Gly Gly Ser Leu | | |
| | 2660 | 2665 | 2670 |
| 5 | Pro Ser Arg His Gln Thr His Gly Ser His Leu Arg Leu His Gln Met | | |
| | 2675 | 2680 | 2685 |
| | Ser Val Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Val Cys Arg Ala Asn Asn Asn Ile | | |
| 10 | 2690 | 2695 | 2700 |
| | Asp Ala Leu Glu Ala Ser Ile Val Ile Ser Val Ser Pro Ser Ala Gly | | |
| | 2705 | 2710 | 2715 |
| | Ser Pro Ser Ala Pro Gly Ser Ser Met Pro Ile Arg Ile Glu Ser Ser | | |
| 15 | 2725 | 2730 | 2735 |
| | Ser Ser His Val Ala Glu Gly Glu Thr Leu Asp Leu Asn Cys Val Val | | |
| | 2740 | 2745 | 2750 |
| 20 | Pro Gly Gln Ala His Ala Gln Val Thr Trp His Lys Arg Gly Gly Ser | | |
| | 2755 | 2760 | 2765 |
| | Leu Pro Ser Tyr His Gln Thr Arg Gly Ser Arg Leu Arg Leu His His | | |
| 25 | 2770 | 2775 | 2780 |
| | Val Ser Pro Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Val Cys Arg Val Met Gly Ser | | |
| | 2785 | 2790 | 2795 |
| | Ser Gly Pro Leu Glu Ala Ser Val Leu Val Thr Ile Glu Ala Ser Gly | | |
| 30 | 2805 | 2810 | 2815 |
| | Ser Ser Ala Val His Val Pro Ala Pro Gly Gly Ala Pro Pro Ile Arg | | |
| | 2820 | 2825 | 2830 |
| 35 | Ile Glu Pro Ser Ser Ser Arg Val Ala Glu Gly Gln Thr Leu Asp Leu | | |
| | 2835 | 2840 | 2845 |
| | Lys Cys Val Val Pro Gly Gln Ala His Ala Gln Val Thr Trp His Lys | | |
| 40 | 2850 | 2855 | 2860 |
| | Arg Gly Gly Asn Leu Pro Ala Arg His Gln Val His Gly Pro Leu Leu | | |
| | 2865 | 2870 | 2875 |
| | Arg Leu Asn Gln Val Ser Pro Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Ser Cys Gln | | |
| 45 | 2885 | 2890 | 2895 |
| | Val Thr Gly Ser Ser Gly Thr Leu Glu Ala Ser Val Leu Val Thr Ile | | |
| | 2900 | 2905 | 2910 |
| 50 | Glu Pro Ser Ser Pro Gly Pro Ile Pro Ala Pro Gly Leu Ala Gln Pro | | |
| | 2915 | 2920 | 2925 |
| | Ile Tyr Ile Glu Ala Ser Ser Ser His Val Thr Glu Gly Gln Thr Leu | | |
| 55 | 2930 | 2935 | 2940 |
| | Asp Leu Asn Cys Val Val Pro Gly Gln Ala His Ala Gln Val Thr Trp | | |
| | 2945 | 2950 | 2955 |
| | | | 2960 |

Tyr Lys Arg Gly Gly Ser Leu Pro Ala Arg His Gln Thr His Gly Ser
 2965 2970 2975
 5 Gln Leu Arg Leu His His Val Ser Pro Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Val
 2980 2985 2990
 Cys Arg Ala Ala Gly Gly Pro Gly Pro Glu Gln Glu Ala Ser Phe Thr
 2995 3000 3005
 10 Val Thr Val Pro Pro Ser Glu Gly Ser Ser Tyr Arg Leu Arg Ser Pro
 3010 3015 3020
 Val Ile Ser Ile Asp Pro Pro Ser Ser Thr Val Gln Gln Gly Gln Asp
 15 3025 3030 3035 3040
 Ala Ser Phe Lys Cys Leu Ile His Asp Gly Ala Ala Pro Ile Ser Leu
 3045 3050 3055
 20 Glu Trp Lys Thr Arg Asn Gln Glu Leu Glu Asp Asn Val His Ile Ser
 3060 3065 3070
 Pro Asn Gly Ser Ile Ile Thr Ile Val Gly Thr Arg Pro Ser Asn His
 3075 3080 3085
 25 Gly Thr Tyr Arg Cys Val Ala Ser Asn Ala Tyr Gly Val Ala Gln Ser
 3090 3095 3100
 Val Val Asn Leu Ser Val His Gly Pro Pro Thr Val Ser Val Leu Pro
 30 3105 3110 3115 3120
 Glu Gly Pro Val Trp Val Lys Val Gly Lys Ala Val Thr Leu Glu Cys
 3125 3130 3135
 35 Val Ser Ala Gly Glu Pro Arg Ser Ser Ala Arg Trp Thr Arg Ile Ser
 3140 3145 3150
 Ser Thr Pro Ala Lys Leu Glu Gln Arg Thr Tyr Gly Leu Met Asp Ser
 3155 3160 3165
 40 His Thr Val Leu Gln Ile Ser Ser Ala Lys Pro Ser Asp Ala Gly Thr
 3170 3175 3180
 Tyr Val Cys Leu Ala Gln Asn Ala Leu Gly Thr Ala Gln Lys Gln Val
 45 3185 3190 3195 3200
 Glu Val Ile Val Asp Thr Gly Ala Met Ala Pro Gly Ala Pro Gln Val
 3205 3210 3215
 50 Gln Ala Glu Glu Ala Glu Leu Thr Val Glu Ala Gly His Thr Ala Thr
 3220 3225 3230
 Leu Arg Cys Ser Ala Thr Gly Ser Pro Ala Arg Thr Ile His Trp Ser
 3235 3240 3245
 55 Lys Leu Arg Ser Pro Leu Pro Trp Gln His Arg Leu Glu Gly Asp Thr
 3250 3255 3260

Leu Ile Ile Pro Arg Val Ala Gln Gln Asp Ser Gly Gln Tyr Ile Cys
 3265 3270 3275 3280
 Asn Ala Thr Ser Pro Ala Gly His Ala Glu Ala Thr Ile Ile Leu His
 3285 3290 3295
 Val Glu Ser Pro Pro Tyr Ala Thr Thr Val Pro Glu His Ala Ser Val
 3300 3305 3310
 10 Gln Ala Gly Glu Thr Val Gln Leu Gln Cys Leu Ala His Gly Thr Pro
 3315 3320 3325
 Pro Leu Thr Phe Gln Trp Ser Arg Val Gly Ser Ser Leu Pro Gly Arg
 3330 3335 3340
 15 Ala Thr Ala Arg Asn Glu Leu Leu His Phe Glu Arg Ala Ala Pro Glu
 3345 3350 3355 3360
 Asp Ser Gly Arg Tyr Arg Cys Arg Val Thr Asn Lys Val Gly Ser Ala
 20 3365 3370 3375
 Glu Ala Phe Ala Gln Leu Leu Val Gln Gly Pro Pro Gly Ser Leu Pro
 3380 3385 3390
 25 Ala Thr Ser Ile Pro Ala Gly Ser Thr Pro Thr Val Gln Val Thr Pro
 3395 3400 3405
 Gln Leu Glu Thr Lys Ser Ile Gly Ala Ser Val Glu Phe His Cys Ala
 3410 3415 3420
 30 Val Pro Ser Asp Arg Gly Thr Gln Leu Arg Trp Phe Lys Glu Gly Gly
 3425 3430 3435 3440
 Gln Leu Pro Pro Gly His Ser Val Gln Asp Gly Val Leu Arg Ile Gln
 35 3445 3450 3455
 Asn Leu Asp Gln Ser Cys Gln Gly Thr Tyr Ile Cys Gln Ala His Gly
 3460 3465 3470
 40 Pro Trp Gly Lys Ala Gln Ala Ser Ala Gln Leu Val Ile Gln Ala Leu
 3475 3480 3485
 Pro Ser Val Leu Ile Asn Ile Arg Thr Ser Val Gln Thr Val Val Val
 3490 3495 3500
 45 Gly His Ala Val Glu Phe Glu Cys Leu Ala Leu Gly Asp Pro Lys Pro
 3505 3510 3515 3520
 Gln Val Thr Trp Ser Lys Val Gly Gly His Leu Arg Pro Gly Ile Val
 50 3525 3530 3535
 Gln Ser Gly Gly Val Val Arg Ile Ala His Val Glu Leu Ala Asp Ala
 3540 3545 3550
 55 Gly Gln Tyr Arg Cys Thr Ala Thr Asn Ala Ala Gly Thr Thr Gln Ser
 3555 3560 3565
 His Val Leu Leu Leu Val Gln Ala Leu Pro Gln Ile Ser Met Pro Gln

| | 3570 | 3575 | 3580 |
|----|---|------|-----------|
| | Glu Val Arg Val Pro Ala Gly Ser Ala Ala Val Phe Pro Cys Ile Ala | | |
| | 3585 | 3590 | 3595 3600 |
| 5 | Ser Gly Tyr Pro Thr Pro Asp Ile Ser Trp Ser Lys Leu Asp Gly Ser | | |
| | 3605 | 3610 | 3615 |
| 10 | Leu Pro Pro Asp Ser Arg Leu Glu Asn Asn Met Leu Met Leu Pro Ser | | |
| | 3620 | 3625 | 3630 |
| | Val Gln Pro Gln Asp Ala Gly Thr Tyr Val Cys Thr Ala Thr Asn Arg | | |
| | 3635 | 3640 | 3645 |
| 15 | Gln Gly Lys Val Lys Ala Phe Ala His Leu Gln Val Pro Glu Arg Val | | |
| | 3650 | 3655 | 3660 |
| | Val Pro Tyr Phe Thr Gln Thr Pro Tyr Ser Phe Leu Pro Leu Pro Thr | | |
| | 3665 | 3670 | 3675 3680 |
| 20 | Ile Lys Asp Ala Tyr Arg Lys Phe Glu Ile Lys Ile Thr Phe Arg Pro | | |
| | 3685 | 3690 | 3695 |
| 25 | Asp Ser Ala Asp Gly Met Leu Leu Tyr Asn Gly Gln Lys Arg Val Pro | | |
| | 3700 | 3705 | 3710 |
| | Gly Ser Pro Thr Asn Leu Ala Asn Arg Gln Pro Asp Phe Ile Ser Phe | | |
| | 3715 | 3720 | 3725 |
| 30 | Gly Leu Val Gly Gly Arg Pro Glu Phe Arg Phe Asp Ala Gly Ser Gly | | |
| | 3730 | 3735 | 3740 |
| | Met Ala Thr Ile Arg His Pro Thr Pro Leu Ala Leu Gly His Phe His | | |
| | 3745 | 3750 | 3755 3760 |
| 35 | Thr Val Thr Leu Leu Arg Ser Leu Thr Gln Gly Ser Leu Ile Val Gly | | |
| | 3765 | 3770 | 3775 |
| 40 | Asp Leu Ala Pro Val Asn Gly Thr Ser Gln Gly Lys Phe Gln Gly Leu | | |
| | 3780 | 3785 | 3790 |
| | Asp Leu Asn Glu Glu Leu Tyr Leu Gly Gly Tyr Pro Asp Tyr Gly Ala | | |
| | 3795 | 3800 | 3805 |
| 45 | Ile Pro Lys Ala Gly Leu Ser Ser Gly Phe Ile Gly Cys Val Arg Glu | | |
| | 3810 | 3815 | 3820 |
| | Leu Arg Ile Gln Gly Glu Glu Ile Val Phe His Asp Leu Asn Leu Thr | | |
| | 3825 | 3830 | 3835 3840 |
| 50 | Ala His Gly Ile Ser His Cys Pro Thr Cys Arg Asp Arg Pro Cys Gln | | |
| | 3845 | 3850 | 3855 |
| | Asn Gly Gly Gln Cys His Asp Ser Glu Ser Ser Ser Tyr Val Cys Val | | |
| | 3860 | 3865 | 3870 |
| 55 | Cys Pro Ala Gly Phe Thr Gly Ser Arg Cys Glu His Ser Gln Ala Leu | | |
| | 3875 | 3880 | 3885 |

His Cys His Pro Glu Ala Cys Gly Pro Asp Ala Thr Cys Val Asn Arg
 3890 3895 3900

5 Pro Asp Gly Arg Gly Tyr Thr Cys Arg Cys His Leu Gly Arg Ser Gly
 3905 3910 3915 3920

Leu Arg Cys Glu Glu Gly Val Thr Val Thr Thr Pro Ser Leu Ser Gly
 3925 3930 3935

10 Ala Gly Ser Tyr Leu Ala Leu Pro Ala Leu Thr Asn Thr His His Glu
 3940 3945 3950

Leu Arg Leu Asp Val Glu Phe Lys Pro Leu Ala Pro Asp Gly Val Leu
 15 3955 3960 3965

Leu Phe Ser Gly Gly Lys Ser Gly Pro Val Glu Asp Phe Val Ser Leu
 3970 3975 3980

20 Ala Met Val Gly Gly His Leu Glu Phe Arg Tyr Glu Leu Gly Ser Gly
 3985 3990 3995 4000

Leu Ala Val Leu Arg Thr Ala Glu Pro Leu Ala Leu Gly Arg Trp His
 4005 4010 4015

25 Arg Val Ser Ala Glu Arg Leu Asn Lys Asp Gly Ser Leu Arg Val Asn
 4020 4025 4030

Gly Gly Arg Pro Val Leu Arg Ser Ser Pro Gly Lys Ser Gln Gly Leu
 30 4035 4040 4045

Asn Leu His Thr Leu Leu Tyr Leu Gly Gly Val Glu Pro Ser Val Pro
 4050 4055 4060

35 Leu Ser Pro Ala Thr Asn Met Ser Ala His Phe Arg Gly Cys Val Gly
 4065 4070 4075 4080

Glu Val Ser Val Asn Gly Lys Arg Leu Asp Leu Thr Tyr Ser Phe Leu
 4085 4090 4095

40 Gly Ser Gln Gly Ile Gly Gln Cys Tyr Asp Ser Ser Pro Cys Glu Arg
 4100 4105 4110

Gln Pro Cys Gln His Gly Ala Thr Cys Met Pro Ala Gly Glu Tyr Glu
 45 4115 4120 4125

Phe Gln Cys Leu Cys Arg Asp Gly Ile Lys Gly Asp Leu Cys Glu His
 4130 4135 4140

50 Glu Glu Asn Pro Cys Gln Leu Arg Glu Pro Cys Leu His Gly Gly Thr
 4145 4150 4155 4160

Cys Gln Gly Thr Arg Cys Leu Cys Leu Pro Gly Phe Ser Gly Pro Arg
 4165 4170 4175

55 Cys Gln Gln Gly Ser Gly His Gly Ile Ala Glu Ser Asp Trp His Leu
 4180 4185 4190

Glu Gly Ser Gly Gly Asn Asp Ala Pro Gly Gln Tyr Gly Ala Tyr Phe
 4195 4200 4205
 5 His Asp Asp Gly Phe Leu Ala Phe Pro Gly His Val Phe Ser Arg Ser
 4210 4215 4220
 Leu Pro Glu Val Pro Glu Thr Ile Glu Leu Glu Val Arg Thr Ser Thr
 4225 4230 4235 4240
 10 Ala Ser Gly Leu Leu Leu Trp Gln Gly Val Glu Val Gly Glu Ala Gly
 4245 4250 4255
 Gln Gly Lys Asp Phe Ile Ser Leu Gly Leu Gln Asp Gly His Leu Val
 4260 4265 4270
 15 Phe Arg Tyr Gln Leu Gly Ser Gly Glu Ala Arg Leu Val Ser Glu Asp
 4275 4280 4285
 Pro Ile Asn Asp Gly Glu Trp His Arg Val Thr Ala Leu Arg Glu Gly
 20 4290 4295 4300
 Arg Arg Gly Ser Ile Gln Val Asp Gly Glu Glu Leu Val Ser Gly Arg
 4305 4310 4315 4320
 25 Ser Pro Gly Pro Asn Val Ala Val Asn Ala Lys Gly Ser Ile Tyr Ile
 4325 4330 4335
 Gly Gly Ala Pro Asp Val Ala Thr Leu Thr Gly Gly Arg Phe Ser Ser
 30 4340 4345 4350
 Gly Ile Thr Gly Cys Val Lys Asn Leu Val Leu His Ser Ala Arg Pro
 4355 4360 4365
 Gly Ala Pro Pro Pro Gln Pro Leu Asp Leu Gln His Arg Ala Gln Ala
 35 4370 4375 4380
 Gly Ala Asn Thr Arg Pro Cys Pro Ser
 4385 4390
 40
 <210> 2
 <211> 195
 <212> PRT
 45 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 Asp Ala Pro Gly Gln Tyr Gly Ala Tyr Phe His Asp Asp Gly Phe Leu
 1 5 10 15
 50 Ala Phe Pro Gly His Val Phe Ser Arg Ser Leu Pro Glu Val Pro Glu
 20 25 30
 Thr Ile Glu Leu Glu Val Arg Thr Ser Thr Ala Ser Gly Leu Leu Leu
 55 35 40 45
 Trp Gln Gly Val Glu Val Gly Glu Ala Gly Gln Gly Lys Asp Phe Ile
 50 55 60

Ser Leu Gly Leu Gln Asp Gly His Leu Val Phe Arg Tyr Gln Leu Gly
 85 70 75 80
 5 Ser Gly Glu Ala Arg Leu Val Ser Glu Asp Pro Ile Asn Asp Gly Glu
 85 90 95
 Trp His Arg Val Thr Ala Leu Arg Glu Gly Arg Arg Gly Ser Ile Gln
 100 105 110
 10 Val Asp Gly Glu Glu Leu Val Ser Gly Arg Ser Pro Gly Pro Asn Val
 115 120 125
 15 Ala Val Asn Ala Lys Gly Ser Val Tyr Ile Gly Gly Ala Pro Asp Val
 130 135 140
 Ala Thr Leu Thr Gly Gly Arg Phe Ser Ser Gly Ile Thr Gly Cys Val
 145 150 155 160
 20 Lys Asn Leu Val Leu His Ser Ala Arg Pro Gly Ala Pro Pro Pro Gln
 165 170 175
 Pro Leu Asp Leu Gln His Arg Ala Gln Ala Gly Ala Asn Thr Arg Pro
 180 185 190
 25 Cys Pro Ser
 195
 30
 <210> 3
 <211> 508
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35
 <400> 3
 Arg Thr Cys Arg Cys Lys Asn Asn Val Val Gly Arg Leu Cys Asn Glu
 1 5 10 15
 40 Cys Ala Asp Arg Ser Phe His Leu Ser Thr Arg Asn Pro Asp Gly Cys
 20 25 30
 Leu Lys Cys Phe Cys Met Gly Val Ser Arg His Cys Thr Ser Ser Ser
 35 40 45
 45 Trp Ser Arg Ala Gln Leu His Gly Ala Ser Glu Glu Pro Gly His Phe
 50 55 60
 50 Ser Leu Thr Asn Ala Ala Ser Thr His Thr Thr Asn Glu Gly Ile Phe
 65 70 75 80
 Ser Pro Thr Pro Gly Glu Leu Gly Phe Ser Ser Phe His Arg Leu Leu
 85 90 95
 55 Ser Gly Pro Tyr Phe Trp Ser Leu Pro Ser Arg Phe Leu Gly Asp Lys
 100 105 110
 Val Thr Ser Tyr Gly Gly Glu Leu Arg Phe Thr Val Thr Gln Arg Ser

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|
| | 115 | | 120 | | 125 | | | | | | | | | | | | | | |
| | Gln | Pro | Gly | Ser | Thr | Pro | Leu | His | Gly | Gln | Pro | Leu | Val | Val | Leu | Gln | | | |
| | 130 | | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | | | | |
| 5 | Gly | Asn | Asn | Ile | Ile | Leu | Glu | His | His | Val | Ala | Gln | Glu | Pro | Ser | Pro | | | |
| | 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 | | | |
| 10 | Gly | Gln | Pro | Ser | Thr | Phe | Ile | Val | Pro | Phe | Arg | Glu | Gln | Ala | Trp | Gln | | | |
| | | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | | | | |
| | Arg | Pro | Asp | Gly | Gln | Pro | Ala | Thr | Arg | Glu | His | Leu | Leu | Met | Ala | Leu | | | |
| | | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | | | | |
| 15 | Ala | Gly | Ile | Asp | Thr | Leu | Leu | Ile | Arg | Ala | Ser | Tyr | Ala | Gln | Gln | Pro | | | |
| | | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | | | | |
| | Ala | Glu | Ser | Arg | Leu | Ser | Gly | Ile | Ser | Met | Asp | Val | Ala | Val | Pro | Glu | | | |
| | 210 | | | | | | 215 | | | | 220 | | | | | | | | |
| 20 | Glu | Thr | Gly | Gln | Asp | Pro | Ala | Leu | Glu | Val | Glu | Gln | Cys | Ser | Cys | Pro | | | |
| | 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 | | | |
| 25 | Pro | Gly | Tyr | Leu | Gly | Pro | Ser | Cys | Gln | Asp | Cys | Asp | Thr | Gly | Tyr | Thr | | | |
| | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | | | | | |
| | Arg | Thr | Pro | Ser | Gly | Leu | Tyr | Leu | Gly | Thr | Cys | Glu | Arg | Cys | Ser | Cys | | | |
| | | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | | | | |
| 30 | His | Gly | His | Ser | Glu | Ala | Cys | Glu | Pro | Glu | Thr | Gly | Ala | Cys | Gln | Gly | | | |
| | | 275 | | | | | | 280 | | | | | 285 | | | | | | |
| | Cys | Gln | His | His | Thr | Glu | Gly | Pro | Arg | Cys | Glu | Gln | Cys | Gln | Pro | Gly | | | |
| | 290 | | | | | | 295 | | | | | 300 | | | | | | | |
| 35 | Tyr | Tyr | Gly | Asp | Ala | Gln | Arg | Gly | Thr | Pro | Gln | Asp | Cys | Gln | Leu | Cys | | | |
| | 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | 320 | | | | |
| 40 | Pro | Cys | Tyr | Gly | Asp | Pro | Ala | Ala | Gly | Gln | Ala | Ala | Leu | Thr | Cys | Phe | | | |
| | | | | 325 | | | | | 330 | | | | | | 335 | | | | |
| | Leu | Asp | Thr | Asp | Gly | His | Pro | Thr | Cys | Asp | Ala | Cys | Ser | Pro | Gly | His | | | |
| | | | | 340 | | | | | 345 | | | | | 350 | | | | | |
| 45 | Ser | Gly | Arg | His | Cys | Glu | Arg | Cys | Ala | Pro | Gly | Tyr | Tyr | Gly | Asn | Pro | | | |
| | | 355 | | | | | | 360 | | | | | 365 | | | | | | |
| | Ser | Gln | Gly | Gln | Pro | Cys | Gln | Arg | Asp | Ser | Gln | Val | Pro | Gly | Pro | Ile | | | |
| | 370 | | | | | | 375 | | | | | 380 | | | | | | | |
| 50 | Gly | Cys | Asn | Cys | Asp | Pro | Gln | Gly | Ser | Val | Ser | Ser | Gln | Cys | Asp | Ala | | | |
| | 385 | | | | | 390 | | | | | 395 | | | | | 400 | | | |
| 55 | Ala | Gly | Gln | Cys | Gln | Cys | Lys | Ala | Gln | Val | Glu | Gly | Leu | Thr | Cys | Ser | | | |
| | | | | 405 | | | | | 410 | | | | | | 415 | | | | |
| | His | Cys | Arg | Pro | His | His | Phe | His | Leu | Ser | Ala | Ser | Asn | Pro | Asp | Gly | | | |
| | | | | 420 | | | | | 425 | | | | | 430 | | | | | |

18

Cys Leu Pro Cys Phe Cys Met Gly Ile Thr Gln Gln Cys Ala Ser Ser
 435 440 445
 5 Ala Tyr Thr Arg His Leu Ile Ser Thr His Phe Ala Pro Gly Asp Phe
 450 455 460
 Gln Gly Phe Ala Leu Val Asn Pro Gln Arg Asn Ser Arg Leu Thr Gly
 465 470 475 480
 10 Glu Phe Thr Val Glu Pro Val Pro Glu Gly Ala Gln Leu Ser Phe Gly
 485 490 495
 Asn Phe Ala Gln Leu Gly His Glu Ser Phe Tyr Trp
 15 500 505

 <210> 4
 20 <211> 199
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 4
 25 Met Lys Trp Val Trp Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Trp Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 Glu Arg Asp Cys Arg Val Ser Ser Phe Arg Val Lys Glu Asn Phe Asp
 20 25 30
 30 Lys Ala Arg Phe Ser Gly Thr Trp Tyr Ala Met Ala Lys Lys Asp Pro
 35 40 45
 Glu Gly Leu Phe Leu Gln Asp Asn Ile Val Ala Glu Phe Ser Val Asp
 35 50 55 60
 Glu Thr Gly Gln Met Ser Ala Thr Ala Lys Gly Arg Val Arg Leu Leu
 65 70 75 80
 40 Asn Asn Trp Asp Val Cys Ala Asp Met Val Gly Thr Phe Thr Asp Thr
 85 90 95
 Glu Asp Pro Ala Lys Phe Lys Met Lys Tyr Trp Gly Val Ala Ser Phe
 100 105 110
 45 Leu Gln Lys Gly Asn Asp Asp His Trp Ile Val Asp Thr Asp Tyr Asp
 115 120 125
 Thr Tyr Ala Val Gln Tyr Ser Cys Arg Leu Leu Asn Leu Asp Gly Thr
 50 130 135 140
 Cys Ala Asp Ser Tyr Ser Phe Val Phe Ser Arg Asp Pro Asn Gly Leu
 145 150 155 160
 55 Pro Pro Glu Ala Gln Lys Ile Val Arg Gln Arg Gln Glu Glu Leu Cys
 165 170 175
 Leu Ala Arg Gln Tyr Arg Leu Ile Val His Asn Gly Tyr Cys Asp Gly

180 185 190
 Arg Ser Glu Arg Asn Leu Leu
 195
 5
 <210> 5
 <211> 199
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 15 Met Lys Trp Val Trp Ala Leu Leu Leu Ala Ala Trp Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 Glu Arg Asp Cys Arg Val Ser Ser Phe Arg Val Lys Glu Asn Phe Asp
 20 20 25 30
 Lys Ala Arg Phe Ser Gly Thr Trp Tyr Ala Met Ala Lys Lys Asp Pro
 25 35 40 45
 Glu Gly Leu Phe Leu Gln Asp Asn Ile Val Ala Glu Phe Ser Val Asp
 50 55 60
 25 Glu Thr Gly Gln Met Ser Ala Thr Ala Lys Gly Arg Val Arg Leu Leu
 65 70 75 80
 Asn Asn Trp Asp Val Cys Ala Asp Met Val Gly Thr Phe Thr Asp Thr
 30 85 90 95
 Glu Asp Pro Ala Lys Phe Lys Met Lys Tyr Trp Gly Val Ala Ser Phe
 100 105 110
 35 Leu Gln Lys Gly Asn Asp Asp His Trp Ile Val Asp Thr Asp Tyr Asp
 115 120 125
 Thr Tyr Ala Val Gln Tyr Ser Cys Arg Leu Leu Asn Leu Asp Gly Thr
 130 135 140
 40 Cys Ala Asp Ser Tyr Ser Phe Val Phe Ser Arg Asp Pro Asn Gly Leu
 145 150 155 160
 Pro Pro Glu Ala Gln Lys Ile Val Arg Gln Arg Gln Glu Glu Leu Cys
 45 165 170 175
 Leu Ala Arg Gln Tyr Arg Leu Ile Val His Asn Gly Tyr Cys Asp Gly
 180 185 190
 50 Arg Ser Glu Arg Asn Leu Leu
 195
 55 <210> 6
 <211> 199
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<400> 6

Met Lys Trp Val Trp Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Trp Ala Ala Ala
 1 5 10 15

Glu Arg Asp Cys Arg Val Ser Ser Phe Arg Val Lys Glu Asn Phe Asp
 20 25 30

Lys Ala Arg Phe Ser Gly Thr Trp Tyr Ala Met Ala Lys Lys Asp Pro
 35 40 45

Glu Gly Leu Phe Leu Gln Asp Asn Ile Val Ala Glu Phe Ser Val Asp
 50 55 60

Glu Thr Gly Gln Met Ser Ala Thr Ala Lys Gly Arg Val Arg Leu Leu
 65 70 75 80

Asn Asn Trp Asp Val Cys Ala Asp Met Val Gly Thr Phe Thr Asp Thr
 85 90 95

Glu Asp Pro Ala Lys Phe Lys Met Lys Tyr Trp Gly Val Ala Ser Phe
 100 105 110

Leu Gln Lys Gly Asn Asp Asp His Trp Ile Val Asp Thr Asp Tyr Asp
 115 120 125

Thr Tyr Ala Val Gln Tyr Ser Cys Arg Leu Leu Asn Leu Asp Gly Thr
 130 135 140

Cys Ala Asp Ser Tyr Ser Phe Val Phe Ser Arg Asp Pro Asn Gly Leu
 145 150 155 160

Pro Pro Glu Ala Gln Lys Ile Val Arg Gln Arg Gln Glu Glu Leu Cys
 165 170 175

Leu Ala Arg Gln Tyr Arg Leu Ile Val His Asn Gly Tyr Cys Asp Gly
 180 185 190

Arg Ser Glu Arg Asn Leu Leu
 195

<210> 7

<211> 182

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Glu Arg Asp Cys Arg Val Ser Ser Phe Arg Val Lys Glu Asn Phe Asp
 1 5 10 15

Lys Ala Arg Phe Ser Gly Thr Trp Tyr Ala Met Ala Lys Lys Asp Pro
 20 25 30

Glu Gly Leu Phe Leu Gln Asp Asn Ile Val Ala Glu Phe Ser Val Asp
 35 40 45

22

Leu Arg Thr Tyr Gly Leu Pro Cys His Cys Pro Phe Lys Glu Gly Thr
 131 135 140

5 Tyr Ser Leu Pro Lys Ser Glu Phe Val Val Pro Asp Leu Glu Leu Pro
 145 150 155 160

Ser Trp Leu Thr Thr Gly Asn Tyr Arg Ile Glu Ser Val Leu Ser Ser
 165 170 175

10 Ser Gly Lys Arg Leu Gly Cys Ile Lys Ile Ala Ala Ser Leu Lys Gly
 180 185 190

Ile

15

<210> 9
 20 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9

25 Met Gln Ser Leu Met Gln Ala Pro Leu Leu Ile Ala Leu Gly Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Ala Thr Pro Ala Gln Ala His Leu Lys Lys Pro Ser Gln Leu Ser
 20 25 30

30 Ser Phe Ser Trp Asp Asn Cys Phe Glu Gly Lys Asp Pro Ala Val Ile
 35 40 45

Arg Ser Leu Thr Leu Glu Pro Asp Pro Ile Val Val Pro Gly Asn Val
 50 55 60

Thr Leu Ser Val Val Gly Ser Thr Ser Val Pro Leu Ser Ser Pro Leu
 65 70 75 80

40 Lys Val Asp Leu Val Leu Glu Lys Glu Val Ala Gly Leu Trp Ile Lys
 85 90 95

Ile Pro Cys Thr Asp Tyr Ile Gly Ser Cys Thr Phe Glu His Phe Cys
 100 105 110

45 Asp Val Leu Asp Met Leu Ile Pro Thr Gly Glu Pro Cys Pro Glu Pro
 115 120 125

Leu Arg Thr Tyr Gly Leu Pro Cys His Cys Pro Phe Lys Glu Gly Thr
 130 135 140

Tyr Ser Leu Pro Lys Ser Glu Phe Ala Val Pro Asp Leu Glu Leu Pro
 145 150 155 160

55 Ser Trp Leu Thr Thr Gly Asn Tyr Arg Ile Glu Ser Val Leu Ser Ser
 165 170 175

Ser Gly Lys Arg Leu Gly Cys Ile Lys Ile Ala Ala Ser Leu Lys Gly

180 185 190

Ile

5

<210> 10
 <211> 178
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 15 Leu Leu Ala Thr Pro Ala Gln Ala His Leu Lys Lys Pro Ser Gln Leu
 1 5 10 15

Ser Ser Phe Ser Trp Asp Asn Cys Asp Glu Gly Lys Asp Pro Ala Val
 20 25 30

20 Ile Arg Ser Leu Thr Leu Glu Pro Asp Pro Ile Val Val Pro Gly Asn
 35 40 45

Val Thr Leu Ser Val Val Gly Ser Thr Ser Val Pro Leu Ser Ser Pro
 50 55 60

25 Leu Lys Val Asp Leu Val Leu Glu Lys Glu Val Ala Gly Leu Trp Ile
 65 70 75 80

30 Lys Ile Pro Cys Thr Asp Tyr Ile Gly Ser Cys Thr Phe Glu His Phe
 85 90 95

Cys Asp Val Leu Asp Met Leu Ile Pro Thr Gly Glu Pro Cys Pro Glu
 100 105 110

35 Pro Leu Arg Thr Tyr Gly Leu Pro Cys His Cys Pro Phe Lys Glu Gly
 115 120 125

Thr Tyr Ser Leu Pro Lys Ser Glu Phe Val Val Pro Asp Leu Glu Leu
 130 135 140

40 Pro Ser Trp Leu Thr Thr Gly Asn Tyr Arg Ile Glu Ser Val Leu Ser
 145 150 155 160

45 Ser Ser Gly Lys Arg Leu Gly Cys Ile Lys Ile Ala Ala Ser Leu Lys
 165 170 175

Gly Ile

50

<210> 11
 <211> 200
 <212> PRT
 55 <213> Homo sapiens

<400> 11
 Arg Ala Gly Pro Pro Phe Pro Met Gln Ser Leu Met Gln Ala Pro Leu

24

1 5 10 15
 Leu Ile Ala Leu Gly Leu Leu Leu Ala Ala Pro Ala Gln Ala His Leu
 20 25 30
 5 Lys Lys Pro Ser Gln Leu Ser Ser Phe Ser Trp Asp Asn Cys Asp Glu
 35 40 45
 10 Gly Lys Asp Pro Ala Val Ile Arg Ser Leu Thr Leu Glu Pro Asp Pro
 50 55 60
 Ile Ile Val Pro Gly Asn Val Thr Leu Ser Val Met Gly Ser Thr Ser
 65 70 75 80
 15 Val Pro Leu Ser Ser Pro Leu Lys Val Asp Leu Val Leu Glu Lys Glu
 85 90 95
 Val Ala Gly Leu Trp Ile Lys Ile Pro Cys Thr Asp Tyr Ile Gly Ser
 100 105 110
 20 Cys Thr Phe Glu His Phe Cys Asp Val Leu Asp Met Leu Ile Pro Thr
 115 120 125
 25 Gly Glu Pro Cys Pro Glu Pro Leu Arg Thr Tyr Gly Leu Pro Cys His
 130 135 140
 Cys Pro Phe Lys Glu Gly Thr Tyr Ser Leu Pro Lys Ser Glu Phe Val
 145 150 155 160
 30 Val Pro Asp Leu Glu Leu Pro Ser Trp Leu Thr Thr Gly Asn Tyr Arg
 165 170 175
 Ile Glu Ser Val Leu Ser Ser Ser Gly Lys Arg Leu Gly Cys Ile Lys
 180 185 190
 35 Ile Ala Ala Ser Leu Lys Gly Ile
 195 200
 40
 <210> 12
 <211> 189
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45
 <400> 12
 Met Gln Ala Pro Leu Leu Ile Ala Leu Gly Leu Leu Leu Ala Thr Pro
 1 5 10 15
 50 Ala Gln Ala His Leu Lys Lys Pro Ser Gln Leu Ser Ser Phe Ser Trp
 20 25 30
 Asp Asn Cys Asp Glu Gly Lys Asp Pro Ala Val Ile Arg Ser Leu Thr
 35 40 45
 55 Leu Glu Pro Asp Pro Ile Val Val Pro Gly Asn Val Thr Leu Ser Val
 50 55 60

Val Gly Ser Thr Ser Val Pro Leu Ser Ser Pro Leu Lys Val Asp Leu
 65 70 75 80
 Val Leu Glu Lys Glu Val Ala Gly Leu Trp Ile Lys Ile Pro Cys Thr
 85 90 95
 Asp Tyr Ile Gly Ser Cys Thr Phe Glu His Phe Cys Asp Val Leu Asp
 100 105 110
 Met Leu Ile Pro Thr Gly Glu Pro Cys Pro Glu Pro Leu Arg Thr Tyr
 115 120 125
 Gly Leu Pro Cys His Cys Pro Phe Lys Glu Gly Thr Tyr Ser Leu Pro
 130 135 140
 Lys Ser Glu Phe Val Val Pro Asp Leu Glu Leu Pro Ser Trp Leu Thr
 145 150 155 160
 Thr Gly Asn Tyr Arg Ile Glu Ser Val Leu Ser Ser Ser Gly Lys Arg
 165 170 175
 Leu Gly Cys Ile Lys Ile Ala Ala Ser Leu Lys Gly Ile
 180 185
 <210> 13
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 13
 Met Gln Ser Leu Met Gln Ala Pro Leu Leu Ile Ala Leu Gly Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Ala Thr Pro Ala Gln Ala His Leu Lys Lys Pro Ser Gln Leu Ser
 20 25 30
 Ser Phe Ser Trp Asp Asn Cys Asp Glu Gly Lys Asp Pro Ala Val Ile
 35 40 45
 Arg Ser Leu Thr Leu Glu Pro Asp Pro Ile Val Val Pro Gly Asn Val
 50 55 60
 Thr Leu Ser Val Val Gly Ser Thr Ser Val Pro Leu Ser Ser Pro Leu
 65 70 75 80
 Lys Val Asp Leu Val Leu Glu Lys Glu Val Ala Gly Leu Trp Ile Lys
 85 90 95
 Ile Pro Cys Thr Asp Tyr Ile Gly Ser Cys Thr Phe Glu His Phe Cys
 100 105 110
 Asp Val Leu Asp Met Leu Ile Pro Thr Gly Glu Pro Cys Pro Glu Pro
 115 120 125
 Leu Arg Thr Tyr Gly Leu Pro Cys His Cys Pro Phe Lys Glu Gly Thr
 130 135 140

20

Tyr Ser Leu Pro Lys Ser Glu Phe Val Val Pro Asp Leu Glu Leu Pro
 145 150 155 160
 5 Ser Trp Leu Thr Thr Gly Asn Tyr Arg Ile Glu Ser Val Leu Ser Ser
 165 170 175
 Ser Gly Lys Arg Leu Gly Cys Ile Lys Ile Ala Ala Ser Leu Lys Gly
 180 185 190
 10 Ile
 15
 <210> 14
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20
 <400> 14
 Met Gln Ser Leu Met Gln Ala Pro Leu Leu Ile Ala Leu Gly Leu Leu
 1 5 10 15
 25 Leu Ala Thr Pro Ala Gln Ala His Leu Lys Lys Pro Ser Gln Leu Ser
 20 25 30
 Ser Phe Ser Trp Asp Asn Cys Asp Glu Gly Lys Asp Pro Ala Val Ile
 35 40 45
 30 Arg Ser Leu Thr Leu Glu Pro Asp Pro Ile Val Val Pro Gly Asn Val
 50 55 60
 Thr Leu Ser Val Val Gly Ser Thr Ser Val Pro Leu Ser Ser Pro Leu
 65 70 75 80
 Lys Val Asp Leu Val Leu Glu Lys Glu Val Ala Gly Leu Trp Ile Lys
 85 90 95
 40 Ile Pro Cys Thr Asp Tyr Ile Gly Ser Cys Thr Phe Glu His Phe Cys
 100 105 110
 Asp Val Leu Asp Met Leu Ile Pro Thr Gly Glu Pro Cys Pro Glu Pro
 115 120 125
 45 Leu Arg Thr Tyr Gly Leu Pro Cys His Cys Pro Phe Lys Glu Gly Thr
 130 135 140
 Tyr Ser Leu Pro Lys Ser Glu Phe Val Val Pro Asp Leu Glu Leu Pro
 145 150 155 160
 Ser Trp Leu Thr Thr Gly Asn Tyr Arg Ile Glu Ser Val Leu Ser Ser
 165 170 175
 55 Ser Gly Lys Arg Leu Gly Cys Ile Lys Ile Ala Ala Ser Leu Lys Gly
 180 185 190
 Ile

5 <210> 15
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 15
 Met Gln Ser Leu Met Gln Ala Pro Leu Leu Ile Ala Leu Gly Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Ala Thr Pro Ala Gln Ala His Leu Lys Lys Pro Ser Gln Leu Ser
 15 20 25 30
 Ser Phe Ser Trp Asp Asn Cys Asp Glu Gly Lys Asp Pro Ala Val Ile
 35 40 45
 20 Arg Ser Leu Thr Leu Glu Pro Asp Pro Ile Val Val Pro Gly Asn Val
 50 55 60
 Thr Leu Ser Val Val Gly Ser Thr Ser Val Pro Leu Ser Ser Pro Leu
 65 70 75 80
 25 Lys Val Asp Leu Val Leu Glu Lys Glu Val Ala Gly Leu Trp Ile Lys
 85 90 95
 Ile Pro Cys Thr Asp Tyr Ile Gly Ser Cys Thr Phe Glu His Phe Cys
 30 100 105 110
 Asp Val Leu Asp Met Leu Ile Pro Thr Gly Glu Pro Cys Pro Glu Pro
 115 120 125
 35 Leu Arg Thr Tyr Gly Leu Pro Cys His Cys Pro Phe Lys Glu Gly Thr
 130 135 140
 Tyr Ser Leu Pro Lys Ser Glu Phe Val Val Pro Asp Leu Glu Leu Pro
 145 150 155 160
 40 Ser Trp Leu Thr Thr Gly Asn Tyr Arg Ile Glu Ser Val Leu Ser Ser
 165 170 175
 Ser Gly Lys Arg Leu Gly Cys Ile Lys Ile Ala Ala Ser Leu Lys Gly
 45 180 185 190
 Ile

50
 <210> 16
 <211> 193
 <212> PRT
 55 <213> Homo sapiens

<400> 16
 Met Gln Ser Leu Met Gln Ala Pro Leu Leu Ile Ala Leu Gly Leu Leu

28

1 5 10 15
 Leu Ala Thr Pro Ala Gln Ala His Leu Lys Lys Pro Ser Gln Leu Ser
 20 25 30
 5 Ser Phe Ser Trp Asp Asn Cys Asp Glu Gly Lys Asp Pro Ala Val Ile
 35 40 45
 10 Arg Ser Leu Thr Leu Glu Pro Asp Pro Ile Val Val Pro Gly Asn Val
 50 55 60
 Thr Leu Ser Val Val Gly Ser Thr Ser Val Pro Leu Ser Ser Pro Leu
 65 70 75 80
 15 Lys Val Asp Leu Val Leu Glu Lys Glu Val Ala Gly Leu Trp Ile Lys
 85 90 95
 Ile Pro Cys Thr Asp Tyr Ile Gly Ser Cys Thr Phe Glu His Phe Cys
 100 105 110
 20 Asp Val Leu Asp Met Leu Ile Pro Thr Gly Glu Pro Cys Pro Glu Pro
 115 120 125
 25 Leu Arg Thr Tyr Gly Leu Pro Cys His Cys Pro Phe Lys Glu Gly Thr
 130 135 140
 Tyr Ser Leu Pro Lys Ser Glu Phe Val Val Pro Asp Leu Glu Leu Pro
 145 150 155 160
 30 Ser Trp Leu Thr Thr Gly Asn Tyr Arg Ile Glu Ser Val Leu Ser Ser
 165 170 175
 Ser Gly Lys Arg Leu Gly Cys Ile Lys Ile Ala Ala Ser Leu Lys Gly
 180 185 190
 35 Ile

 40
 <210> 17
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45
 <400> 17
 Met Thr Cys Lys Met Ser Gln Leu Glu Arg Asn Ile Glu Thr Ile Ile
 1 5 10 15
 50 Asn Thr Phe His Gln Tyr Ser Val Lys Leu Gly His Pro Asp Thr Leu
 20 25 30
 Asn Gln Gly Glu Phe Lys Glu Leu Val Arg Lys Asp Leu Gln Asn Phe
 35 40 45
 55 Leu Lys Lys Glu Asn Lys Asn Glu Lys Val Ile Glu His Ile Met Glu
 50 55 60

Asp Leu Asp Thr Asn Ala Asp Lys Gln Leu Ser Phe Glu Glu Phe Ile
 65 70 75 80
 Met Leu Met Ala Arg Leu Thr Trp Ala Ser His Glu Lys Met His Glu
 5 85 90 95
 Gly Asp Glu Gly Pro Gly His His His Lys Pro Gly Leu Gly Glu Gly
 100 105 110
 10 Thr Pro
 15 <210> 18
 <211> 93
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 18
 Met Leu Thr Glu Leu Glu Lys Ala Leu Asn Ser Ile Ile Asp Val Tyr
 1 5 10 15
 His Lys Tyr Ser Leu Ile Lys Gly Asn Phe His Ala Val Tyr Arg Asp
 25 20 25 30
 Asp Leu Lys Lys Leu Leu Glu Thr Glu Cys Pro Gln Tyr Ile Arg Lys
 35 40 45
 30 Lys Gly Ala Asp Val Trp Phe Lys Glu Leu Asp Ile Asn Thr Asp Gly
 50 55 60
 Ala Val Asn Phe Gln Glu Phe Leu Ile Leu Val Ile Lys Met Gly Val
 65 70 75 80
 35 Ala Ala His Lys Lys Ser His Glu Glu Ser His Lys Glu
 85 90
 40 <210> 19
 <211> 92
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45 <400> 19
 Met Thr Lys Leu Glu Glu His Leu Glu Gly Ile Val Asn Ile Phe His
 1 5 10 15
 50 Gln Tyr Ser Val Arg Lys Gly His Phe Asp Thr Leu Ser Lys Gly Glu
 20 25 30
 Leu Lys Gln Leu Leu Thr Lys Glu Leu Ala Asn Thr Ile Lys Asn Ile
 35 40 45
 55 Lys Asp Lys Ala Val Ile Asp Glu Ile Phe Gln Gly Leu Asp Ala Asn
 50 55 60

Gln Asp Glu Gln Val Asp Phe Gln Glu Phe Ile Ser Leu Val Ala Ile
 55 70 75 80

Ala Leu Lys Ala Ala His Tyr His Thr His Lys Glu
 85 90

10 <210> 20
 <211> 92
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 20
 Met Thr Lys Leu Glu Glu His Leu Glu Gly Ile Val Asn Ile Phe His
 1 5 10 15

Gln Tyr Ser Val Arg Lys Gly His Phe Asp Thr Leu Ser Lys Gly Glu
 20 25 30

20 Leu Lys Gln Leu Leu Thr Lys Glu Leu Ala Asn Thr Ile Lys Asn Ile
 35 40 45

25 Lys Asp Lys Ala Val Ile Asp Glu Ile Phe Gln Gly Leu Asp Ala Asn
 50 55 60

Gln Asp Glu Gln Val Asp Phe Gln Glu Phe Ile Ser Leu Val Ala Ile
 65 70 75 80

30 Ala Leu Lys Ala Ala His Tyr His Thr His Lys Glu
 85 90

35 <210> 21
 <211> 91
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <400> 21
 Thr Lys Leu Glu Glu His Leu Glu Gly Ile Val Asn Ile Phe His Gln
 1 5 10 15

45 Tyr Ser Val Arg Lys Gly His Phe Asp Thr Leu Ser Lys Gly Glu Leu
 20 25 30

Lys Gln Leu Leu Thr Lys Glu Leu Ala Asn Thr Ile Lys Asn Ile Lys
 35 40 45

50 Asp Lys Ala Val Ile Asp Glu Ile Phe Gln Gly Leu Asp Ala Asn Gln
 50 55 60

Asp Glu Gln Val Asp Phe Gln Glu Phe Ile Ser Leu Val Ala Ile Ala
 65 70 75 80

55 Leu Lys Ala Ala His Tyr His Thr His Lys Glu
 85 90

<210> 22
 <211> 93
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22
 Met Leu Thr Glu Leu Glu Lys Ala Leu Asn Ser Ile Ile Asp Val Tyr
 10 1 5 10 15
 His Lys Tyr Ser Leu Ile Lys Gly Asn Phe His Ala Val Tyr Arg Asp
 20 25 30
 15 Asp Leu Lys Lys Leu Leu Glu Thr Glu Cys Pro Gln Tyr Ile Arg Lys
 35 40 45
 Lys Gly Ala Asp Val Trp Phe Lys Glu Leu Asp Ile Asn Thr Asp Gly
 50 55 60
 20 Ala Val Asn Phe Gln Glu Phe Leu Ile Leu Val Ile Lys Met Gly Val
 65 70 75 80
 Ala Ala His Lys Lys Ser His Glu Glu Ser His Lys Glu
 25 85 90

<210> 23
 30 <211> 92
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 23
 35 Met Thr Lys Leu Glu Glu His Leu Glu Gly Ile Val Asn Ile Phe His
 1 5 10 15
 Gln Tyr Ser Val Arg Lys Gly His Phe Asp Thr Leu Ser Lys Gly Glu
 20 25 30
 40 Leu Lys Gln Leu Leu Thr Lys Glu Leu Ala Asn Thr Ile Lys Asn Ile
 35 40 45
 Lys Asp Lys Ala Val Ile Asp Glu Ile Phe Gln Gly Leu Asp Ala Asn
 45 50 55 60
 Gln Asp Glu Gln Val Asp Phe Gln Glu Phe Ile Ser Leu Val Ala Ile
 65 70 75 80
 50 Ala Leu Lys Ala Ala His Tyr His Thr His Lys Glu
 85 90

55 <210> 24
 <211> 85
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

32

<400> 24

Asp Asn Gly Asp Val Cys Gln Asp Cys Ile Gln Met Val Thr Asp Ile
 1 5 10 15

Gln Thr Ala Val Arg Thr Asn Ser Thr Phe Val Gln Ala Leu Val Glu
 20 25 30

His Val Lys Glu Glu Cys Asp Arg Leu Gly Pro Gly Met Ala Asp Ile
 35 40 45

Cys Lys Asn Tyr Ile Ser Gln Tyr Ser Glu Ile Ala Ile Gln Met Met
 50 55 60

Met His Met Gln Asp Gln Gln Pro Lys Glu Ile Cys Ala Leu Val Gly
 65 70 75 80

Phe Cys Asp Glu Val
 85

<210> 25

<211> 381

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Met Ala Glu Ser His Leu Leu Gln Trp Leu Leu Leu Leu Leu Pro Thr
 1 5 10 15

Leu Cys Gly Pro Gly Thr Ala Ala Trp Thr Thr Ser Ser Leu Ala Cys
 20 25 30

Ala Gln Gly Pro Glu Phe Trp Cys Gln Ser Leu Glu Gln Ala Leu Gln
 35 40 45

Cys Arg Ala Leu Gly His Cys Leu Gln Glu Val Trp Gly His Val Gly
 50 55 60

Ala Asp Asp Leu Cys Gln Glu Cys Glu Asp Ile Val His Ile Leu Asn
 65 70 75 80

Lys Met Ala Lys Glu Ala Ile Phe Gln Asp Thr Met Arg Lys Phe Leu
 85 90 95

Glu Gln Glu Cys Asn Val Leu Pro Leu Lys Leu Leu Met Pro Gln Cys
 100 105 110

Asn Gln Val Leu Asp Asp Tyr Phe Pro Leu Val Ile Asp Tyr Phe Gln
 115 120 125

Asn Gln Ile Asp Ser Asn Gly Ile Cys Met His Leu Gly Leu Cys Lys
 130 135 140

Ser Arg Gln Pro Glu Pro Glu Gln Glu Pro Gly Met Ser Asp Pro Leu
 145 150 155 160

Pro Lys Pro Leu Arg Asp Pro Leu Pro Asp Pro Leu Leu Asp Lys Leu
 165 170 175
 Val Leu Pro Val Leu Pro Gly Ala Leu Gln Ala Arg Pro Gly Pro His
 180 185 190
 Thr Gln Asp Leu Ser Glu Gln Gln Phe Pro Ile Pro Leu Pro Tyr Cys
 195 200 205
 Trp Leu Cys Arg Ala Leu Ile Lys Arg Ile Gln Ala Met Ile Pro Lys
 210 215 220
 Gly Ala Leu Arg Val Ala Val Ala Gln Val Cys Arg Val Val Pro Leu
 225 230 235 240
 Val Ala Gly Gly Ile Cys Gln Cys Leu Ala Glu Arg Tyr Ser Val Ile
 245 250 255
 Leu Leu Asp Thr Leu Leu Gly Arg Met Leu Pro Gln Leu Val Cys Arg
 260 265 270
 Leu Val Leu Arg Cys Ser Met Asp Asp Ser Ala Gly Pro Arg Ser Pro
 275 280 285
 Thr Gly Glu Trp Leu Pro Arg Asp Ser Glu Cys His Leu Cys Met Ser
 290 295 300
 Val Thr Thr Gln Ala Gly Asn Ser Ser Glu Gln Ala Ile Pro Gln Ala
 305 310 315 320
 Met Leu Gln Ala Cys Val Gly Ser Trp Leu Asp Arg Glu Lys Cys Lys
 325 330 335
 Gln Phe Val Glu Gln His Thr Pro Gln Leu Leu Thr Leu Val Pro Arg
 340 345 350
 Gly Trp Asp Ala His Thr Thr Cys Gln Ala Leu Gly Val Cys Gly Thr
 355 360 365
 Met Ser Ser Pro Leu Gln Cys Ile His Ser Pro Asp Leu
 370 375 380
 <210> 26
 <211> 379
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 26
 Met Ala Glu Ser His Leu Leu Gln Trp Leu Leu Leu Leu Leu Pro Thr
 1 5 10 15
 Leu Cys Gly Pro Gly Thr Ala Ala Trp Thr Thr Ser Ser Leu Ala Cys
 20 25 30
 Ala Gln Gly Pro Glu Phe Trp Cys Gln Ser Leu Glu Gln Ala Leu Gln
 35 40 45

Cys Arg Ala Leu Gly His Cys Leu Gln Glu Val Trp Gly His Val Gly
 50 55 60
 5 Ala Asp Asp Leu Cys Gln Glu Cys Glu Asp Ile Val His Ile Leu Asn
 65 70 75 80
 Lys Met Ala Lys Glu Ala Ile Phe Gln Asp Thr Met Arg Lys Phe Leu
 85 90 95
 10 Glu Gln Glu Cys Asn Val Leu Pro Leu Lys Leu Leu Met Pro Gln Cys
 100 105 110
 15 Asn Gln Val Leu Asp Asp Tyr Phe Pro Leu Val Ile Asp Tyr Phe Gln
 115 120 125
 Asn Gln Thr Asp Ser Asn Gly Ile Cys Met His Leu Gly Cys Lys Ser
 130 135 140
 20 Arg Gln Pro Glu Pro Glu Gln Glu Pro Gly Met Ser Asp Pro Leu Pro
 145 150 155 160
 Lys Pro Leu Arg Asp Pro Leu Pro Asp Pro Leu Leu Asp Lys Leu Val
 165 170 175
 25 Leu Pro Val Leu Pro Gly Ala Leu Gln Ala Arg Pro Gly Pro His Thr
 180 185 190
 30 Gln Asp Leu Ser Glu Gln Gln Phe Pro Ile Pro Leu Pro Tyr Cys Trp
 195 200 205
 Cys Arg Ala Leu Ile Lys Arg Ile Gln Ala Met Ile Pro Lys Gly Ala
 210 215 220
 35 Leu Arg Val Ala Val Ala Gln Val Cys Arg Val Val Pro Leu Val Ala
 225 230 235 240
 Gly Gly Ile Cys Gln Cys Leu Ala Glu Arg Tyr Ser Val Ile Leu Leu
 245 250 255
 40 Asp Thr Leu Leu Gly Arg Met Leu Pro Gln Leu Val Cys Arg Leu Val
 260 265 270
 45 Leu Arg Cys Ser Met Asp Asp Ser Ala Gly Pro Arg Ser Pro Thr Gly
 275 280 285
 Glu Trp Leu Pro Arg Asp Ser Glu Cys His Leu Cys Met Ser Val Thr
 290 295 300
 50 Thr Gln Ala Gly Asn Ser Ser Glu Gln Ala Ile Pro Gln Ala Met Leu
 305 310 315 320
 Gln Ala Cys Val Gly Ser Trp Leu Asp Arg Glu Lys Cys Lys Gln Phe
 325 330 335
 55 Val Glu Gln His Thr Pro Gln Leu Leu Thr Leu Val Pro Arg Gly Trp
 340 345 350

Asp Ala His Thr Thr Cys Gln Ala Leu Gly Val Cys Gly Thr Met Ser
 355 360 365
 Ser Pro Leu Gln Cys Ile His Ser Pro Asp Leu
 5 370 375
 <210> 27
 10 <211> 527
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 27
 15 Met Tyr Ala Leu Phe Leu Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Ala Leu Ala
 1 5 10 15
 Gly Pro Val Leu Gly Leu Lys Glu Cys Thr Arg Gly Ser Ala Val Trp
 20 20 25 30
 Cys Gln Asn Val Lys Thr Ala Ser Asp Cys Gly Ala Val Lys His Cys
 35 40 45
 Leu Gln Thr Val Trp Asn Lys Pro Thr Val Lys Ser Leu Pro Cys Asp
 25 50 55 60
 Ile Cys Lys Asp Val Val Thr Ala Ala Gly Asp Met Leu Lys Asp Ash
 65 70 75 80
 30 Ala Thr Glu Glu Glu Ile Leu Val Tyr Leu Glu Lys Thr Cys Asp Trp
 85 90 95
 Leu Pro Lys Pro Asn Met Ser Ala Ser Cys Lys Glu Ile Val Asp Ser
 35 100 105 110
 Tyr Leu Pro Val Ile Leu Asp Ile Ile Lys Gly Glu Met Ser Arg Pro
 115 120 125
 Gly Glu Val Cys Ser Ala Leu Asn Leu Cys Glu Ser Leu Gln Lys His
 40 130 135 140
 Leu Ala Glu Leu Asn His Gln Lys Gln Leu Glu Ser Asn Lys Ile Pro
 145 150 155 160
 45 Glu Leu Asp Met Thr Glu Val Val Ala Pro Phe Met Ala Asn Ile Pro
 165 170 175
 Leu Leu Leu Tyr Pro Gln Asp Gly Pro Arg Ser Lys Pro Gln Pro Lys
 50 180 185 190
 Asp Asn Gly Asp Val Cys Gln Asp Cys Ile Gln Met Val Thr Asp Ile
 195 200 205
 55 Gln Thr Ala Val Arg Thr Asn Ser Thr Phe Val Gln Ala Leu Val Glu
 210 215 220
 His Val Lys Glu Glu Cys Asp Arg Leu Gly Pro Gly Met Ala Asp Ile
 225 230 235 240

Cys Lys Asn Tyr Ile Ser Gln Tyr Ser Glu Ile Ala Ile Gln Met Met
 245 250 255
 Met His Met Gln Asp Gln Gln Pro Lys Glu Ile Cys Ala Leu Val Gly
 260 265 270
 Phe Cys Asp Glu Val Lys Glu Met Pro Met Gln Thr Leu Val Pro Ala
 275 280 285
 Lys Val Ala Ser Lys Asn Val Ile Pro Ala Leu Glu Leu Val Glu Pro
 290 295 300
 Ile Lys Lys His Glu Val Pro Ala Lys Ser Asp Val Tyr Cys Glu Val
 305 310 315 320
 Cys Glu Phe Leu Val Lys Glu Val Thr Lys Leu Ile Asp Asn Asn Lys
 325 330 335
 Thr Glu Lys Glu Ile Leu Asp Ala Phe Asp Lys Met Cys Ser Lys Leu
 340 345 350
 Pro Lys Ser Leu Ser Glu Glu Cys Gln Glu Val Val Asp Thr Tyr Gly
 355 360 365
 Ser Ser Ile Leu Ser Ile Leu Leu Glu Glu Val Ser Pro Glu Leu Val
 370 375 380
 Cys Ser Met Leu His Leu Cys Ser Gly Thr Arg Leu Pro Ala Leu Thr
 385 390 395 400
 Val His Val Thr Gln Pro Lys Asp Gly Gly Phe Cys Glu Val Cys Lys
 405 410 415
 Lys Leu Val Gly Tyr Leu Asp Arg Asn Leu Glu Lys Asn Ser Thr Lys
 420 425 430
 Gln Glu Ile Leu Ala Ala Leu Glu Lys Gly Cys Ser Phe Leu Pro Asp
 435 440 445
 Pro Tyr Gln Lys Gln Cys Asp Gln Phe Val Ala Glu Tyr Glu Pro Val
 450 455 460
 Leu Ile Glu Ile Leu Val Glu Val Met Asp Pro Ser Phe Val Cys Leu
 465 470 475 480
 Lys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Ala His Lys Pro Leu Leu Gly Thr Glu
 485 490 495
 Lys Cys Ile Trp Gly Pro Ser Tyr Trp Cys Gln Asn Thr Glu Thr Ala
 500 505 510
 Ala Gln Cys Asn Ala Val Glu His Cys Lys Arg His Val Trp Asn
 515 520 525

<211> 523
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 28
 Met Tyr Ala Leu Phe Leu Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Ala Leu Ala
 1 5 10 15

10 Gly Pro Val Leu Gly Leu Lys Glu Cys Thr Arg Gly Ser Ala Val Trp
 20 25 30

Cys Gln Asn Val Lys Thr Ala Ser Asp Cys Gly Ala Val Lys His Cys
 35 40 45

15 Leu Gln Thr Val Trp Asn Lys Pro Thr Val Lys Ser Leu Pro Cys Asp
 50 55 60

Ile Cys Lys Asp Val Val Thr Ala Ala Gly Asp Met Leu Lys Asp Asn
 65 70 75 80

20 Ala Thr Glu Glu Glu Ile Leu Val Tyr Leu Glu Lys Thr Cys Asp Trp
 85 90 95

25 Leu Pro Lys Pro Asn Met Ser Ala Ser Cys Lys Glu Ile Val Asp Ser
 100 105 110

Tyr Leu Pro Val Ile Leu Asp Ile Ile Lys Gly Glu Met Ser Arg Pro
 115 120 125

30 Gly Glu Val Cys Ser Ala Leu Leu Cys Glu Ser Leu Gln Lys His Leu
 130 135 140

Ala Glu Leu Asn His Gln Lys Gln Leu Glu Ser Asn Lys Ile Pro Glu
 145 150 155 160

35 Leu Asp Met Thr Glu Val Val Ala Pro Phe Met Ala Asn Ile Pro Leu
 165 170 175

40 Leu Leu Tyr Pro Gln Asp Gly Pro Arg Ser Lys Pro Gln Pro Lys Asp
 180 185 190

Asn Gly Asp Val Cys Gln Asp Cys Ile Gln Met Val Thr Asp Ile Gln
 195 200 205

45 Thr Ala Val Arg Thr Asn Ser Thr Phe Val Gln Ala Leu Val Glu His
 210 215 220

Val Lys Glu Glu Cys Asp Arg Leu Gly Pro Gly Met Ala Asp Ile Cys
 225 230 235 240

50 Lys Asn Tyr Ile Ser Gln Tyr Ser Glu Ile Ala Ile Gln Met Met Met
 245 250 255

His Met Gln Pro Lys Glu Ile Cys Ala Leu Val Gly Phe Cys Asp Glu
 260 265 270

55 Val Lys Glu Met Pro Met Gln Thr Leu Val Pro Ala Lys Val Ala Ser
 275 280 285

A

Lys Asn Val Ile Pro Ala Leu Glu Leu Val Glu Pro Ile Lys Lys His
 290 295 300

5 Glu Val Pro Ala Lys Ser Asp Val Tyr Cys Glu Val Cys Glu Phe Leu
 315 320 325

Val Lys Glu Val Thr Lys Leu Ile Asp Asn Asn Lys Thr Glu Lys Glu
 325 330 335

10 Ile Leu Asp Ala Phe Asp Lys Met Cys Ser Lys Leu Pro Lys Ser Leu
 340 345 350

15 Ser Glu Glu Cys Gln Glu Val Val Asp Thr Tyr Gly Ser Ser Ile Leu
 355 360 365

Ser Ile Leu Leu Glu Glu Val Ser Pro Glu Leu Val Cys Ser Met Leu
 370 375 380

20 His Leu Cys Ser Gly Thr Arg Leu Pro Ala Leu Thr Val His Val Thr
 385 390 395 400

Gln Pro Lys Asp Gly Gly Phe Cys Glu Val Cys Lys Lys Leu Val Gly
 405 410 415

25 Tyr Leu Asp Arg Asn Leu Glu Lys Asn Ser Thr Lys Gln Glu Ile Leu
 420 425 430

Ala Ala Leu Glu Lys Gly Cys Ser Phe Leu Pro Asp Pro Tyr Gln Lys
 30 435 440 445

Gln Cys Asp Gln Phe Val Ala Glu Tyr Glu Pro Val Leu Ile Glu Ile
 450 455 460

35 Leu Val Glu Val Met Asp Pro Ser Phe Val Cys Leu Lys Ile Gly Ala
 465 470 475 480

Cys Pro Ser Ala His Lys Pro Leu Leu Gly Thr Glu Lys Cys Ile Trp
 485 490 495

40 Gly Pro Ser Tyr Trp Cys Gln Asn Thr Glu Thr Ala Ala Gln Cys Asn
 500 505 510

45 Ala Val Glu His Cys Lys Arg His Val Trp Asn
 515 520

50 <210> 29
 <211> 380
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 29
 55 Met Ala Glu Ser His Leu Leu Gln Trp Leu Leu Leu Leu Leu Pro Thr
 1 5 10 15

Leu Cys Gly Pro Gly Thr Ala Ala Trp Thr Thr Ser Ser Leu Ala Cys

| | | | |
|----|---|-----|-----|
| | 20 | 25 | 30 |
| | Ala Gln Gly Pro Glu Phe Trp Cys Gln Ser Leu Glu Gln Ala Leu Gln | | |
| | 35 | 40 | 45 |
| 5 | Cys Arg Ala Leu Gly His Cys Leu Gln Glu Val Trp Gly His Val Gly | | |
| | 50 | 55 | 60 |
| 10 | Ala Asp Asp Leu Cys Gln Glu Cys Glu Asp Ile Val His Ile Leu Asn | | |
| | 65 | 70 | 75 |
| | Lys Met Ala Lys Glu Ala Ile Phe Gln Asp Thr Met Arg Lys Phe Leu | | |
| | 85 | 90 | 95 |
| 15 | Glu Gln Glu Cys Asn Val Leu Pro Leu Lys Leu Leu Met Pro Gln Cys | | |
| | 100 | 105 | 110 |
| | Asn Gln Val Leu Asp Asp Tyr Phe Pro Leu Val Ile Asp Tyr Phe Gln | | |
| | 115 | 120 | 125 |
| 20 | Asn Gln Thr Asp Ser Asn Gly Ile Cys Met His Gly Leu Cys Lys Ser | | |
| | 130 | 135 | 140 |
| | Arg Gln Pro Glu Pro Glu Gln Glu Pro Gly Met Ser Asp Pro Leu Pro | | |
| 25 | 145 | 150 | 155 |
| | Lys Pro Leu Arg Asp Pro Leu Pro Asp Pro Leu Leu Asp Lys Leu Val | | |
| | 165 | 170 | 175 |
| 30 | Leu Pro Val Leu Pro Gly Ala Leu Gln Ala Arg Pro Gly Pro His Thr | | |
| | 180 | 185 | 190 |
| | Gln Asp Leu Ser Glu Gln Gln Phe Pro Ile Pro Leu Pro Tyr Cys Trp | | |
| | 195 | 200 | 205 |
| 35 | Leu Cys Arg Ala Leu Ile Lys Arg Ile Gln Ala Met Ile Pro Lys Gly | | |
| | 210 | 215 | 220 |
| | Ala Leu Ala Val Ala Val Ala Gln Val Cys Arg Val Val Pro Leu Val | | |
| 40 | 225 | 230 | 235 |
| | Ala Gly Gly Ile Cys Gln Cys Leu Ala Glu Arg Tyr Ser Val Ile Leu | | |
| | 245 | 250 | 255 |
| 45 | Leu Asp Thr Leu Leu Gly Arg Met Leu Pro Gln Leu Val Cys Arg Leu | | |
| | 260 | 265 | 270 |
| | Val Leu Arg Cys Ser Met Asp Asp Ser Ala Gly Pro Arg Ser Pro Thr | | |
| | 275 | 280 | 285 |
| 50 | Gly Glu Trp Leu Pro Arg Asp Ser Glu Cys His Leu Cys Met Ser Val | | |
| | 290 | 295 | 300 |
| | Thr Thr Gln Ala Gly Asn Ser Ser Glu Gln Ala Ile Pro Gln Ala Met | | |
| 55 | 305 | 310 | 315 |
| | Leu Gln Ala Cys Val Gly Ser Trp Leu Asp Arg Glu Lys Cys Lys Gln | | |
| | 325 | 330 | 335 |

Phe Val Glu Gln His Thr Pro Gln Leu Leu Thr Leu Val Pro Arg Gly
340 345 350

Trp Asp Ala His Thr Thr Cys Gln Ala Leu Gly Val Cys Gly Thr Met
355 360 365

Ser Ser Pro Leu Gln Cys Ile His Ser Pro Asp Leu
370 375 380

<210> 30

<211> 4124

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 30

| | | | | | | | |
|----|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|------|
| | atgagagaat | gggtttctgct | catgtccgtg | ctgctctgtg | gcctggctgg | ccccacacac | 60 |
| 20 | ctgttccage | caagcctggg | gctggacatg | gccaaaggcc | tcttggataa | ctactgcttc | 120 |
| | ccggagaacc | tgctgggcat | gcaggaagcc | atccagcagg | ccatcaagag | ccatgagatt | 180 |
| | ctgagcatct | cagacccgca | gacgctggcc | agtgtgctga | cagccggggg | gcagagctcc | 240 |
| | ctgaacgata | ctgcctggg | catctcctat | gagcccagca | cccccgagcc | tccccacaa | 300 |
| | gtcccagcac | tcaccagcct | ctcagaagag | gaactgcttg | cctggctgca | aaggggcctc | 360 |
| 25 | cgccatgagg | ttctggaggg | taatgtgggc | tacctgcggg | tggacagcgt | cccggggccag | 420 |
| | gaggtgctga | gcattgatgg | ggagttcctg | gtggcccacg | tgtgggggaa | tctcatgggc | 480 |
| | acctccgctt | tagtgctgga | tctccggcac | tgcacaggag | gccaggtctc | tggcattccc | 540 |
| | tacatcatct | cctacctgca | cccagggaac | accatcctgc | acgtggacac | tatctacaac | 600 |
| | cgccccctca | acaccaccac | ggagatctgg | accttgcccc | aggtcctggg | agaaagggtac | 660 |
| 30 | ggtgccgaca | aggatgtggg | ggtcctcacc | agcagccaga | ccagggcggt | ggccgaggac | 720 |
| | atcgcgacac | tccttaagca | gatgcgcagg | gccatcgtgg | tgggcgagcg | gactggggga | 780 |
| | ggggccctgg | acctccggaa | gctgaggata | ggcgagctcg | acttcttctt | cacggtgccc | 840 |
| | gtgtccagggt | ccctggggcc | ccttgggtga | ggcagccaga | cgtgggaggg | cagcgggggtg | 900 |
| | ctgcccctgtg | tggggactcc | ggccgagcag | ggcctggaga | aagccctggc | catcctcact | 960 |
| 35 | ctgcgcagcg | cccttccagg | ggtagtccac | tgcctccagg | aggtcctgaa | ggactactac | 1020 |
| | acgctgggtg | acggtgtgcc | cacctgctg | cagcacttgg | ccagcatgga | cttctccacg | 1080 |
| | gtggtctccg | aggaagatct | ggtcaccaag | ctcaatgccg | gcctgcaggc | tgcgtctgag | 1140 |
| | gaccccaggc | tcctgggtgc | agccatcggg | cccacagaaa | ctccttcttg | gcccgcgccc | 1200 |
| | gacgctgcag | ccgaagactc | accaggggtg | gccccagagt | tgcctgagga | cgaggctatc | 1260 |
| 40 | cggaagcagc | tggtggactc | tgtgttccag | gtgtcggtgc | tgccaggcaa | tgtgggctac | 1320 |
| | ctgcgcttcg | atagttttgc | tgaagcctcc | gtcctgggtg | tgttggcccc | atatgtcctg | 1380 |
| | cgccagggtg | gggagccgct | acaggacacg | gagcacctca | tcattggacct | gcgccacaac | 1440 |
| | cctggagggg | catcctctgc | tgtgcccctg | ctcctgtcct | acttccaggg | ccctgaggcc | 1500 |
| | ggccccgctg | acctcttcac | cacctatgat | cgccgcacca | acatcacgca | ggagcacttc | 1560 |
| 45 | agccacatgg | agctcccggg | cccacgctac | agcaccacaac | gtgggggtgta | tctgctcacc | 1620 |
| | agccaccgca | cgccgagggc | cgccgaggag | ttgcgcttcc | ttatgcagtc | gctgggctgg | 1680 |
| | gccacactgg | taggtgagat | caccgcgggc | aacctgctgc | acacccgac | gggtccgctg | 1740 |
| | ctggacacac | ccgaaggcag | cctcgcgctc | accgtgcggg | tcctcacctt | catcgacaat | 1800 |
| | cacggcgagg | cctggctggg | tggtggagtg | gtgcccgatg | ccatcgtgct | ggccgaggag | 1860 |
| 50 | gccctggaca | aagcccaggga | agtgtctggg | ttccacacaa | gcctgggggg | cttgggtggg | 1920 |
| | ggcacagggg | acctgctgga | ggcccactat | gctcgggccag | aggtcgtggg | gcagaccagt | 1980 |
| | gcccctctgc | gggccaagct | ggcccagggg | gcctaccgca | cagctgtgga | cttggagtct | 2040 |
| | ctggcctctc | agctcacagc | agacctccag | gaggtgtctg | gggaccacgg | cttgctagtg | 2100 |
| | ttccacagcc | ctggcgagct | gggtgtagag | gaagcaccac | caccaccccc | tgtgttcccc | 2160 |
| 55 | tctccagagg | agctcaccta | ccttattgag | gccctgttca | agacagaggt | gctgcccggc | 2220 |
| | cagctgggct | acctgcgttt | tgacgccatg | gctgaactgg | agacagtga | ggccgtgggg | 2280 |
| | ccacagctgg | tgcggctggg | atggcaacag | ctggtggaca | cggctgcgct | ggtgatcgac | 2340 |
| | ctgcgctaca | acctggcgag | ctactccacg | gccatccccg | tgtctgtctc | ctacttcttt | 2400 |

gaggcagagc cccgccagca cctgtattct gtctttgaca gggccacctc aaaagtcaag 2460
 gaggtgtgga ccttgcccca ggtcgccggc cagcgctacg gctcacacaa ggacctctac 2520
 atcctgatga gccacaccag tggctctgcg gccgaggcct ttgcacacac catgcaggac 2580
 ctgcagcggg ccacgggtcat tggggagccc acggccggag ggcactctc tgtgggcatc 2640
 5 taccaggtgg gcagcagccc cttatatgca tccatgccc cccagatggc catgagtggc 2700
 accacaggca aggcctggga cctggctggg gtggagcccc acatcactgt gcccattgagc 2760
 gaagcccttt ccatagccca ggacatagtg gctctgctg ccaagggtgc cacggtgctg 2820
 cagacggccg ggaagctggg ggctgataac tatgctctg ccgagctggg ggccaagatg 2880
 gccaccaaac tgagcggctc gcagagccgc tactccaggg tgacctcaga agtggcccta 2940
 10 gccgagatcc tgggggctga cctgcagatg ctctccggag acccacacct gaaggcagcc 3000
 catatccctg agaatgccc ggaccgcatt cctggaattg tgcccatgca gatecccttc 3060
 cctgaagtat ttgaagagct gatcaagttt tccctccaca ctaacgtgct tgaggacaac 3120
 attggctact tgaggtttga catgttttggg gacggtgagc tgctcaccac ggtctccagg 3180
 ctgctgggtg agcacatctg gaagaagatc atgcacacgg atgcatgat catcgacatg 3240
 15 aggttcaaca tcggtggccc cacatcctcc attcccatct tgtctccta cttctttgat 3300
 gaaggccctc cagttctgct ggacaagatc tacagccggc ctgatgactc tgtcagtga 3360
 ctctggacac acgcccaggt tgtaggtgaa cgctatggct ccaagaagag catggtcatt 3420
 ctgaccagca gtgtgacggc cggcaccgcg gaggagtcca cctatatcat gaagggctg 3480
 ggccggggccc tggtcattgg ggaggtgacc agtgggggct gccagccacc acagacctac 3540
 20 cacgtgggatg acaccaacct ctacctact atccccacgg cccgttctgt gggggcctcg 3600
 gatggcagct cctgggaagg ggtgggggtg acaccccatg tggttgtccc tgcagaagag 3660
 gctctgcca gggccaagga gatgctccag cacaaccagc tgagggtgaa gcggagccca 3720
 ggcttcgagg accacctgta gggaaggggc ccataggcag agccccaggg cagacagaac 3780
 ctctgggaca cacaccaagg gcactcctgc aggtggccc gcttgaggtt cccaggagca 3840
 25 gcaaaagggc ctgctgagct ctggttaggt tacagctgga ggtgtgtata tatacacaca 3900
 cacacatgta tatacacata tatatgtgta tgtatatata tgtatatata tatggctttc 3960
 caataaccac ctaaatttta acaaagggtc cttctaagtg gtagaacttg ggggtgtatt 4020
 tttaccttcc ttcttcatac ttgtctctt ttcttaata ctcattaatg tgcatatata 4080
 attattttca gatgcagcta tcattattcc aaaatacaaa ataa 4124

<210> 31

<211> 579

<212> ADN

35 <213> Homo sapiens

<400> 31

atgcarwsny tnatgcargc nccnytnytn athgcnnytng gnytnytnyt ngcnacnccn 60
 gncargcnc ayytnaaraa rccnwsncar ytnwsnwsnt tywsntggga yaaytgygay 120
 40 garggnaarg ayccngcngt nathmgnwsn ytnacnytnng arccngaycc nathgtngtn 180
 ccnggnaayg tnacnytnws ngtngtnggn wsnacnwsng tnccnytnws nwsnccnytn 240
 aargtngayy tngtnytnga raargargtn gcnggnytn ggaatharat hccntgyacn 300
 gaytayathg gnwsntgyac nttygaray ttytgygay tnytngayat gytnathccn 360
 acngnggarc cntgyccnga rccnytnmgn acntayggny tnccntgyca ytgycntty 420
 45 aarggngna cntaywsnyt nccnaarwsn garttygtng tnccngayyt ngarytnccn 480
 wsntggytna cnacnggnaa ytaymgnath garwsngtny tnwsnwsnws nggnaarmgn 540
 ytnngntgya thaarathgc ngcnwsnytn aarggnath 579

50 <210> 32

<211> 633

<212> ADN

<213> Homo sapiens

55 <400> 32

tttcttttgcg taaccaatac tggaaggcat ttaaaggacc tctgccgcct cagaccttgc 60
 agttaactcc gccctgaccc acccttcccc atgcagtcct tgatgcaggc tccccctctg 120
 atcgccctgg gcttgcttct cgcgacccct gcgcaagccc acctgaaaaa ggtgagtgc 180

```

ccctctcttca agagctctgtt tgcagcctcc tggcccagct acgggtgtgc gggctctggct 240
gagatatggg ggtggccact ccgtctctca gaattgggtc tctgcactag agccttccaa 300
agtaactaat tatgggatcc tggctctgtac aatgaggggt gcctctaaag acttggtctg 360
ctccaggccc tttttggaga gattaatctc acgtctgcac tctctgccc tccctccaag 420
cgccggagtg aaaatgcaga cagccttaaa actaaggcat tgcctccaaag agattcagtc 480
ctgttaaccc tgcaccttac tcttgacccc cactcttat gtcccccatt ataaggcctg 540
ctgctctcctc tcttcccttg ctgcaatgac ctgaggtctt cctgagagtt gggaggggtt 600
gagagctcttc caaggccaaag aggattcact aag
633

```

<210> 33

<211> 1047

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 33

```

caggagcttg cctctcttctt gggattccaa cgctggcttg agaggagtgg gcagcagggg 60
ggtgggaagt cagagaaggt gccacccaaa ggctatttag gtcagtctcc tgtttggaag 120
ttccaggctc atcatatcct gccttatagt ttacaataca cttttgggag attatgtctt 180
ttgagctctt tagtttagtc ctgcctataa aatgagtagg ataagtgtta tcccagggtc 240
ataggtatgg agtctcatag atgaggtcca gggacggggg tgcctcacc aaggtcacac 300
tgccaggagc tcatttttcc tgtgatctgt gatagtttct tttgtcaacc ttttcttct 360
tctcttctc tgcctgctga ttgtccccag ccctccagc tcagtagctt tctctgggat 420
aactgtgatg aagggaagga ccttgcggtg atcagaagcc tgactctgga gcctgacccc 480
atcgctgctc ctggaaatgt gacccctcagt gtcgtgggca gcaccagtgt cccctgagt 540
tctctctga aggtgagcct ggggggtgggt ggagaagggg aggtgagagg gtctggccag 600
caggggtact ggggcatgta tgcctgggga actgtgaaga atttcagaat cctggattcc 660
cagagaatag tacaggacat gttagttcag acactcttc acaggttcat ggaatctcag 720
gatcataaga ttgaaaggaa tctctgatgt cagcgccagc aacttctctg tgagggcagg 780
agtgaaggat accttgacc tggcagaagc gtctggcct tctctgggcc tgggtggcca 840
ctgctcatta ttatctgaca gctctggttg gccaatgttg ttttgcgtt aattataaaa 900
ttgatatacc aattagccag taatatatag tcactttaga aaacacaagt ggtcaaaaaa 960
taaataaaat aggccaaagt tggtaacttc atgctgttaa tccccacac cttaggaggc 1020
tgaagggtggg tgggacctt tttgagg
1047

```

<210> 34

<211> 1706

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 34

```

acagtagatg ccagtgcatt tcaatgcaag tgttagagcc aatcaatggg tagtgactac 60
ctaaagaatt ttaagactat ggattgagca tgatggctca cggcctgtaa tcccagcctt 120
tggaagggtga aggtgaaagg attgcttgag gccaggagt ccagaccagc ttgggcaaca 180
aagtgaagccc catctctaca aaaaatacaa aattagctgg gtgtggtggc atgtgcctgt 240
ctgtgtttcc cactacatg ggaggtgag cgaggaggat cgtctgagcc caggagtttg 300
aggctgcagt gagtgcagtg agccatgata caaaaaaaa aaataaagaa ttctaagtct 360
atgtatagtt cagtgtaggg ggaataatca catttgatta ttaatgtctg ccattgggac 420
aataatacac tatactcaca catgggccc aatgttgcca ttcctagaac agactatctc 480
taagatctca tccagttaaa aattctatga ttaaaatata ttgctgcttt tttgaagaca 540
gaagagctgg tatgtttgcc ctggaattta cacttataac ctttttcaaa cttttgtttt 600
attttttttt accaggtgga tttagttttg gagaaggagg tggctggcct ctggatcaag 660
atcccatgca cagactacat tggcagctgt accttgaac acttctgtga tgtgcttgac 720
atgttaattc ctactgggga gccctgccc gagccctgc gtacctatgg gcttcttgc 780
cactgtccct tcaaagaagt aagtacttag ggaggagaga gcgttcccc tgtggctaaa 840
gagatggggt ttggagagaa gggctcttgc attctcttc tgcagatctg catgtctctg 900
gatttgtaag ccagtgtgac ctatcaggaa tcacttatct tccgggagcc tcagttatcc 960

```

atctacgaaa tgggagactt gaacttagat gtgatcttca gggcccttta tccatataat 1020
 ccatgctcta cagtgcctatg gccgtctctc atcttgtgcg gctgttttga gaatgggaag 1080
 aggggtggta gttcatggct gcaatcctag cagtggctct aggagaaaga ccccatcagt 1140
 5 aggcctccac tgactggcgg tccactggct ttcccgagg gaaactactc actgcccag 1200
 agcgaattcg ttgtgectga cctggagctg ccagttggc tcaccaccgg gaactaccgc 1260
 atagagagcg tcttgagcag cagtgggaag cgtctgggct gcatcaagat cgtgcctct 1320
 ctaaagggca tatagcatgg catctgccac agcagaatgg agcgggtgta ggaagggtccc 1380
 ttttctctctg ttttgtgttt gccaaaggcca aactcccact ctctgcccc ctttaatccc 1440
 ctttctacag tgagtccact accctcactg aaaatcattt tgtaccactt acatttttagg 1500
 10 ctggggcaag cagccctgac ctaagggaga atgagttgga cagttcttga tagcccaggg 1560
 catctgctgg gctgaccacg ttactcatcc ccgttaacat tctctctaaa gagcctcgtt 1620
 catttccaaa gcagtttaagg aatgggaaca gagtgtttta ggacctgaag aatctttatg 1680
 actctctctc tttctctctt tttttt 1706

15 <210> 35
 <211> 633
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

20 <400> 35
 tttctttgcg taaccaatac tgggaaggcat ttaaaggacc tctgccgcct cagaccttgc 60
 agttaactcc gccctgaccc acccttcccg atgcagtcct tgatgcaggc tcccctcctg 120
 atcgccctgg gcttgcttct cgcgaccctt gcgcaagccc acctgaaaaa ggtgagtgc 180
 25 cctcttttta agagtctgtt tgcagcctcc tggcccagct acgggtgtgc ggggtctggct 240
 gagatatggg ggtggccact ccgttctcta gaattgggtc tctgcactag agccttccaa 300
 agtaactaat tatgggattc tgggtctgtac aatgaggggt gcctctaaag acttgttctg 360
 ctccaggccc tttttggaga gattaatctc acgtctgcac tctctgccc tccctccaag 420
 cgccggagtg aaaatgcaga cagccttaaa actaaggcat tgcccccaag agattcagtc 480
 30 ctgttaaccc tgcaccttac tctgacccc cactccttat gtcccccattg ataaggcctg 540
 ctgctcctac tcttccctg ctggaatgcc ctgaggtctt cctgagagtt gggagggttt 600
 gagagctttc caaggccaag aggattcact aag 633

35 <210> 36
 <211> 1047
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

40 <400> 36
 caggagcttg ccctcttgct gggattccaa cgctggctgg agaggagtgg gcagcagggg 60
 ggtgggaagt cagagaaggt gccaccaaa ggctatttag gtcagtctcc tgtttggaag 120
 ttccaggctc atcatatcct gccttatagt ttacaataca cttttgggag attatgtctt 180
 ttgagtcttt tagtttagtc ctgcctataa aatgagtagg ataagtgtta tcccagggtt 240
 45 ataggtatgg agtctcatag atgaggtcca gggacggggg tgctcacc aaggtcacac 300
 tgccaggagc tcatttttcc tgtgatctgt gatagtttct tttgtcaacc ttttcttct 360
 tctccttctt tgctgcctga ttgtccccag ccacccagc tcagtagctt ttctgggat 420
 aactgtgatg aagggaagga cctgcggtg atcagaagcc tgactctgga gcctgacccc 480
 atcgctgttc ctggaaatgt gaccctcagt gtcgtgggca gcaccagtgt cccctgagt 540
 50 tctcctctga aggtgagcct gggggtgggt ggagaagggg aggtgcgagg gtctggccag 600
 caggggtact ggggcatgta tgcttgggga actgtgaaga atttcagaat cctggattcc 660
 cagagaatag tacaggacat gttagttcag acactcttcc acaggttcat ggaatctcag 720
 gatcataaga ttgaaaggaa tctctgatgt cagcgcagc aacttctctg tgagggcagg 780
 agtgacggat accttgacc tggcagaagc gtcctggcct tctctgggcc tgggtggccaa 840
 55 ctgctcatta ttatctgaca gctctgggtt gccaatgttg ttttctgtt aattataaaa 900
 ttgatatacc aattagccag taatatatag tcaactttaga aaacacaagt ggtcaaaaaa 960
 taaataaaat agggcaagtg tggtaacttc atgcctgtaa tccccacacc cttaggaggc 1020
 tgaagggtggg tgggacctt tttgagg 1047

<210> 37
 <211> 1706
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 37
 acagtagatg ccagtgcat tcaatgcaag tgtagagcc aatcaatggg tagtgactac 60
 10 ctaaagaact ttaagactat ggattgagca tgatggctca cggcctgtaa tcccagcctt 120
 tgggaagggtga aggtgaaagg attgcttgag gccaggagtt ccagaccagc ttgggcaaca 180
 aagtggagccc catctctaca aaaaatacaa aattagctgg gtgtgggtggc atgtgcctgt 240
 ctgtgtttcc cacctacatg ggaggctgag gcaggaggat cgtctgagcc caggagtgtg 300
 aggctgcagt gagtgcagtg agccatgata caaaaaaaaa aaataaagaa ttctaagtct 360
 15 atgtatagtt cagtgtaggg ggaaaattca catttgatta ttaatgtctg ccatggggcac 420
 aataatacac tatactcaca catggggccac aatgttgcca ttcttagaac agactatctc 480
 taagatctca tccagttaaa aattctatga ttaaaatata ttgctgcttt ttggaagaca 540
 gaagagctgg tatgtttgcc ctggaattta cacttataac ctttttcaaa cctttgtttt 600
 attttttttt accaggtgga tttagttttg gagaaggagg tggctggcct ctggatcaag 660
 20 atcccatgca cagactacat tggcagctgt acctttgaac acttctgtga tgtgcttgac 720
 atgttaattc ctactgggga gccctgcccga gagccctctg gtacctatgg gcttccttgc 780
 cactgtccct tcaaagaagt aagtacttag ggaggagaga gcgttacctc tgtggctaaa 840
 gagatgggggt ttggagagaa gggctctttgc attctccttc tgcagatctg catgtctctg 900
 gatattgtaag ccagtgtgac ctatcaggaa tcacttatct tccgggagcc tcagttatcc 960
 25 atctacgaaa tgggagactt gaacttagat gtgatcttca gggcccttta tccatataat 1020
 ccatgctcta cagtgcctatg gccgtctctc atcttgtgcg gctgttttga gaatgggaag 1080
 aggggtggta gttcatggct gcaatcctag cagtggctct aggagaaaga ccccatcagt 1140
 aggetcccac tgactggcgg tccactggct tccccgcagg gaactactc actgcccaag 1200
 agcgaattcg ttgtgcctga cctggagctg cccagttggc tcaccaccgg gaactaccgc 1260
 30 atagagagcg tctgagcag cagtgggaag cgtctgggct gcatcaagat cgctgcctct 1320
 ctaaagggca tatagcatgg catctgccac agcagaatgg agcgggtgtga ggaagggtccc 1380
 ttttctctctg ttttgtgttt gccaaaggcca aactccact ctctgcccc ctttaatccc 1440
 ctttctacag tgagtccact accctcactg aaaatcattt tgtaccactt acatttttagg 1500
 ctggggcaag cagccctgac ctaagggaga atgagttgga cagttcttga tagcccaggg 1560
 35 catctgctgg gctgaccacg ttactcatcc ccgttaacat tctctctaaa gagcctcgtt 1620
 catttccaaa gcagttaagg aatgggaaca gagtgtttta ggacctgaag aatctttatg 1680
 actctctctc tttctctctt tttttt 1706

40 <210> 38
 <211> 1043
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

45 <400> 38
 tttctttgcg taaccaatac tgggaaggcat ttaaaggacc tctgccgcct cagaccttgc 60
 agttaactcc gccctgaccc acccttcccg atgcagtccc tgatgcaggg tcccctcctg 120
 atcgccctgg gcttgcttct cgcgacccct gcgcaagccc acctgaaaa gccatccag 180
 ctcagtagct ttctctggga taactgtgat gaagggaagg accctgcggg gatcagaagc 240
 50 ctgactctgg agcctgaccc catcgtcgtt cctggaaatg tgacctcag tgtcgtgggc 300
 agcaccagtg tccccctgag ttctctctctg aagggtggatt tagttttgga gaaggagggtg 360
 gctggcctct ggatcaagat cccatgcaca gactacattg gcagctgtac ctttgaacac 420
 ttctgtgatg tgcttgacat gtttaattcct actggggagc cctgcccaga gccctgcgt 480
 acctatgggc ttctttgcca ctgtcccttc aaagaaggaa cctactcact gcccaagagc 540
 55 gaattcgttg tgctgacct ggagctgccc agttggctca ccaccggga ctaccgcata 600
 gagagcgtcc tgagcagcag tgggaagcgt ctgggctgca tcaagatcgc tgctctcta 660
 aagggcataat agcatggcat ctgccacagc agaatggagc ggtgtgagga aggtcccttt 720
 tctctgtttt tgtgtttgcc aaggccaaac tccactctc tgccccctt taatccccct 780

tctacagtga gtcactacc ctactgaaa atcattttgt accacttaca ttttaggetg 840
 gggcaagcag ccttgaccta agggagaatg agttggacag ttcttgatag cccagggcat 900
 ctgctgggct gaccacgtta ctcatcccc ttaacattct ctctaaagag cctcgttcat 960
 ttccaaagca gttaaggaaat gggaacagag tgtttttagga cctgaagaat ctttatgact 1020
 5 ctctctcttt ctctctcttt ttt 1043

<210> 39
 <211> 1047
 10 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 39
 15 caggagcttg ccctcttgct gggattccaa cgetggctgg agaggagtgg gcagcagggg 60
 ggtgggaagt cagagaaggt gcccaccaa ggctatttag gtcagtctcc tgtttggaag 120
 ttccaggtct atcatatcct gccttatagt ttacaatata cttttgggag attatgtctt 180
 ttgagtcctt tagtttagtc ctgcctataa aatgagtagg ataagtgtta tcccaggttc 240
 ataggtatgg agtctcatag atgaggctca gggacggggg tgctcacc cagggtcacac 300
 tgccaggagc tcatTTTTcc tgtgatctgt gatagtttct tttgtcaacc ttttcttct 360
 20 tctccttctt tgctgcctga ttgtccccag ccattcccagc tcagtagctt tctctgggat 420
 aactgtgatg aagggaagga ccctgcggtg atcagaagcc tgactctgga gcctgacccc 480
 atcgtcgttc ctggaaatgt gacctcagt gtcgtgggca gcaccagtgt cccctgagt 540
 tctcctctga aggtgagcct ggggtgggt ggagaagggg aggtgcgagg gtctggccag 600
 caggggtact ggggcatgta tgcttgggga actgtgaaga atttcagaat cctggattcc 660
 25 cagagaatag tacaggacat gtagattcag acactctt cagaggttcat ggaatctcag 720
 gatcataaga ttgaaaggaa tctctgatgt cagcgcagc aacttctctg tgagggcagg 780
 agtgacggat accttgacc tggcagaagc gtcttgccct tctctgggcc tgggtggccaa 840
 ctgctcatta ttatctgaca gctctggttg gccaatTTtg ttttctgtt aattataaaa 900
 ttgataacc aattagccag taatatatag tcactttaga aaacacaagt ggtcaaaaaa 960
 30 taaataaaat aggccaaagt tggttaactc atgcctgtaa ttcccacacc cttaggaggc 1020
 tgaagggtggg tgggatcctt tttgagg 1047

<210> 40
 35 <211> 1705
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 40
 40 acagtagatg ccagtgattt caatgcaagt gttagagcca atcaatgggt agtgactacc 60
 taaagaattt taagactatg gattgagcat gatggctcac ggctgtaat cccagccttt 120
 ggaaggtgaa ggtgaaagga ttgcttgagg ccaggagttc cagaccagct tgggcaacaa 180
 agtgagcccc atctctacaa aaaatacaaa attagctggg tgtggtggca tgtgcctgtc 240
 tgtgtttccc acctacatgg gaggtgagg caggaggatc gtctgagccc aggagtTTga 300
 45 ggctgcagtg agtgcagtga gccatgatac aaaaaaaaaa aataaagaat tctaagtcta 360
 tgtatagtcc agtgtagggg gaaaattcac atttgattat taatgtctgc catgggcaca 420
 ataatacact atactcacac atgggccaca atgttgccat tcctagaaca gactatctct 480
 aagatctcat ccagttaaaa attctatgat taaaatatat tgctgctttt ttgaagacag 540
 aagagctggt atgtttggcc tggaaattac acttataacc tttttcaaac ctttgtttta 600
 50 ttttttttta ccagggtgat ttagttttgg agaaggaggt ggctggcctc tggatcaaga 660
 tcccatgcac agactacatt ggcagctgta ccttgaaca cttctgtgat gtgcttgaca 720
 tgtaatttcc tactggggag ccctgcccag agccctgcg tactatggg cttccttgcc 780
 actgtccctt caaagaagta agtacttagg gaggagagag cgttaccct gtggctaaag 840
 agatgggggt tggagagaag ggtctttgca ttctccttct gcagatctgc atgtctctgg 900
 55 atttgtaagc cagtgtgacc tatcaggaat cacttatctt ccgggagcct cagttatcca 960
 tctacgaaat gggagacttg aacttagatg tgatcttcag ggccctttat ccatataatc 1020
 catgctctac agtctatgg ccgtctctca tcttgctggg ctgttttgag aatgggaaga 1080
 ggggtggtag ttcaggtgtg caatcctagc agtggctcta ggagaaagac cccatcagta 1140

```

      gggtcccaact taactgggggt ccaactggctt tcccgcaggg aacctactca ctgcccaga 1200
      cccaatttcgt tctgcttgac ctggagctgc ccagttgggt caccaccggg aactaccgca 1260
      tagagagcgt cctgagcagc agtgggaagg gtctgggctg catcaagatc gctgctctc 1320
      caaagggcac atagcatggc atctgccaca gcagaatgga gcggtgtgag gaaggtccct 1380
      5 tttctctctgt tttgtgtttg ccaaggccaa actcccactc tctgcccccc tttaatcccc 1440
      tttctacagt gagtccacta cctcactga aaatcatttt gtaccactta ctttttaggc 1500
      tggggcaagg agccctgacc taaggagaa tgagttggac agttcttgat agcccagggc 1560
      atctgctggg ctgaccacgt tactcatccc cgttaacatt ctctctaaag agcctcgttc 1620
      atttccaaaag cagtttaagg atgggaacag agtgttttag gacctgaaga atctttatga 1680
      10 ctctctctct tttctctctt tttttt 1705

```

<210> 41

<211> 1043

15 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 41

```

      tttcttttgcg taaccaatac tggaaggcat ttaaaggacc tctgccgctt cagaccttgc 60
      20 agttaactcc gccctgaccc acccttcccg atgcagctcc tgatgcaggc tccccctctg 120
      atcgccctgg gcttgcttct cgcgaccctt gcgcaagccc acctgaaaaa gccatcccag 180
      ctccagtagct tttcctggga taactgtgat gaagggaagg accctgcggt gatcagaagc 240
      ctgactctgg agcctgaccc catcgtcgtt cctggaaatg tgacctcag tgcgtgggc 300
      agcaccagtg tccccctgag ttctcctctg aaggtggatt tagttttgga gaaggagggtg 360
      25 gctggcctct ggatcaagat cccatgcaca gactacattg gcagctgtac ctttgaacac 420
      ttctgtgatg tgcttgacat gttaatctct actggggagc cctgcccaga gccctgcgt 480
      acctatgggc ttctttgcca ctgtcccttc aaagaaggaa cctactcact gcccaagagc 540
      gaattcgttg tgcctgacct ggagctgcc agttggctca ccaccgggaa ctaccgcata 600
      gagagcgtcc tgagcagcag tgggaagcgt ctgggctgca tcaagatcgc tgcctctcta 660
      30 aagggcacat agcatggcat ctgccacagc agaatggagc ggtgtgagga aggtcccttt 720
      tctctgttt tgtgtttgcc aaggccaaac tcccactctc tgccccctt taatccccct 780
      tctacagtga gtccactacc ctactgaaa atcattttgt accacttaca ttttaggctg 840
      gggcaagcag ccctgacctc agggagaatg agttggacag ttcttgatag cccaggggcat 900
      ctgctgggct gaccacgtta ctcatcccc ttaacattct ctctaaagag cctcgttcac 960
      35 ttccaaagca gtttaaggaa gggaacagag tgttttagga cctgaagaat ctttatgact 1020
      ctctctcttt ctctcttttt ttt 1043

```

<210> 42

40 <211> 342

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 42

```

      atgacntgya aratgwsnca rytngarmgn aayathgara cnathathaa yacnttycay 60
      cartaywsng tnaarytngg ncayccngay acnytnaayc argnggartt yaargarytn 120
      gtnmgnaaarg ayytncaraa ytttytnaar aargaraaya araaygaraa rgtnathgar 180
      cayathatgg argayytnga yacnaaygcn gayaarcary tnwsnttyga rgarttyath 240
      atgytnatgg cnmgnytnac ntgggcnwsn caygaraara tgcaygargg ngaygarggn 300
      50 ccnggncayc aycayaarcc nggnytnngn garggnacnc cn 342

```

<210> 43

<211> 4195

55 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 43

5 tttccacctt tggctcttgt aaataatgct gctatgaaca tgaatgtaca aacatctgtt 60
 tgaatccctg cattcaattc ttttgcata ataccagga gcagaatgat ggatcatatg 120
 gtaattctgt gtttatttat ttgaggaaca aacttgccgt tttccataac agctgcaacta 180
 ttttacatto ccactaacag tgcattaggg tttccaattct ctatgccctc accaacactt 240
 10 gttttctggg ttttaaaaga agtagtagtc atccttgtag gtgtcagggtg gtatctcatt 300
 gtcgttttgc ttcattgttt cctaaagatt agtaattttc atatgcttat tgaccatttg 360
 tatactctct tgggagaagt gtctatttga gtctttcccc aattttgatt gggttggttg 420
 ttttttggtg ttgagttgta gggattcttt tatattctgg atattaatcc cttatcagat 480
 atttgtttta caaatatttt ctttgtaaca acagaaacac accacagtct tcaaggttgg 540
 15 aagccagtta atctgagtag cattttgtta gtggtgggga gaggatttgt tctcctgaa 600
 atcctgggga attggccacc tctcttctc ctcttaggca tgaagcgcgt ctggcttctc 660
 caaagaactc tttccctcca ctacctcaga gttagcttcc tctcttcagc cagtgatect 720
 ggggtcccag acacaataat taaccaagag aggggtgaaag gctccctgct gtgtttatgc 780
 aatggctcag gcccttgtga agtgccgagg gaccccaagc agctccatc tcccagggca 840
 20 tggccatcc ccagctttca cagaacagga aagctgtgga ggagtgtggg cagcagggta 900
 ggaaatggata tagcccttgg caacaacaca tttcccaca aagcaccac ccaaaagaac 960
 aacaacgata gttttagttt ttagttaaga gaacaatagt tctcatgact aaaagccatc 1020
 agccaggaca ctgttctcaa cctttttgag gtctttggac cctttgaaac tctgacagaa 1080
 gccatggagg aatgttctca ctgagtgcac gcactcaaaa tgatgcattc aacttcaatt 1140
 25 cagtttcagg gatgtatggc ctgaccacca atgcagggga ttagcaatcg caatagtgga 1200
 gagggcatgg gagtgggaat ctggctggat caagcaagtg gatgccagca gccagaaaa 1260
 agagccccc tacctgcttt ttccttctct ggcactattg cccagcaaat gccttctctt 1320
 ttcgcttct cctacctccc cacccaaat tttcattctg cacagtgatt gccacttca 1380
 ctgggtgaga aacagagact gtagcaactc tggcagggag aagctgtctc tgatggcctg 1440
 30 aagctgtggg cagctggcca agcctaaccg ctataaaaag gagctgcctc tcagccctgc 1500
 atgtctcttg tcagctgtct ttcagaagac ctggtaagtg ggactgtctg ggttggcccc 1560
 gcactttggg cttctcttgg ggagggctcag ggaagtggag cagccttctt gagagaggag 1620
 agagaaagct cagggagggtc tggagcaaa atactcctgg aggtggggag tgaggcaggg 1680
 35 ataaggaagg agagtatcct ccagcacctt ccagtgggta agggcacatt gtctcctagg 1740
 ctggactttt cttgagcaga ggggtgggtg ttaaggaaag tctacgggct cccgtgtgtg 1800
 tgcacatgtc tctgtgtgaa tggacccttc ccttcccac acgtgtatcc ctatcatccc 1860
 acccttcccc ccagaggcca tagccatctg ctggtttggg tatttgagag tgcaggccag 1920
 gacaaggcca tcgcttgggg catgaatcct ctgcgtactg ccctggccag atgcaaatc 1980
 cctgccatgg gattccccag aaggttctgt ttttcagggt gggcaagttc cgtgggcatc 2040
 40 atgttgaccg agctggagaa agccttgaac tctatcatcg acgtctacca caagtactcc 2100
 ctgataaagg ggaatttcca tgcgtctac agggatgacc tgaagaaatt gctagagacc 2160
 gagtgctctc agtatatcag ggtgaggagg ggttgggtgt ggcgggggct ctctgcctgg 2220
 tcttggggct gccctgggcc agcgggtctc cctgccacc ttcatagatg ctatgcctcg 2280
 gctctctctg agatctttaa actctggctt cttctctctc aatcttgaca gaaaaaggtt 2340
 45 gcagacgtct ggttcaaaga gttggatata aacactgatg gtgcagttaa cttccaggag 2400
 ttctctatc tggtgataaa gatgggcgtg gcagcccaca aaaaagcca tgaagaaagc 2460
 cacaagagat agctgagtta ctgggcccag aggctgggcc cctggacatg tacctgcaga 2520
 ataataaagt catcaatacc tcatgcctct ctcttatget tttgtggaat gaggttctc 2580
 ggtgtggagg gaggttggga aaacccaaag gaagaaaaag aaatctatgt tatccacc 2640
 50 tacctctcac aagcctttcc tgetttaccc ctcacctggc ctctgcccc cattcttca 2700
 gccctctcatt tcgagcattg gatttgaggc ttaaggattc aaaaagtcgt catgaatata 2760
 gctgatgatt ttatagtggg tctgaaatgg gtccgggatt tgggaacagg gtggtagtat 2820
 aagaacaact gatactgttc tctaagctaa atcttagctt ccagctacct gtcttagatg 2880
 55 tggctcttgg gaaccttaga gtgatagta catagaagt tgtgggtgtg tgtgtgtgtg 2940
 tctgtgtgtg tgtgtgtgag agagagacag acagaaagag agcaagagag ggaagggggg 3000
 agaggctgat tgtgtgtgtg gtgtgatgta ggtggacaat gttcagagtc ctccattaac 3060
 aggataatcc tcacacctgt ccacatacct gtagtttgtc cttggggatt ttgaaaattt 3120
 ttcctctctc tccactccca aactcccaac tcaattaaat gataaaggaa taggcaata 3180
 ggaaaaataa ttagtaaaac ttaagtcaaa gaataggtta ttcatacgtt gcctatggga 3240
 60 ttctatgctt tgtgatcaga aaattatcta aaaaatactt cccaagggtt ggtacaaggg 3300
 aggccagaag acgagtgggt cttctctgag gtggacatta aaaaagaag aaatgaagg 3360
 ggaacctttt gacaagaatg tcaccccaag ctggatttct atgctgtggt gtggggaatt 3420
 ttctgttctc ctcacttagg tgctggggca gtggtgttag tgatgggtaa aaaggttagg 3480

agctgtcaca gaatcaactaa accaggggttc ttaactttgtc tgtctatata totctgaaat 3540
 tgggttgaaag ttgtgtgcat cattttgagt gacgcaactga gaacattcct ccacgggttc 3600
 catcgagagt ctcgaaaagg cccaacacct caaaaagggtt aagaacactt gtcttgctta 3660
 ctgggttttta gtaacaaatg gcagagtatt tctctctgtc tctctctctt tttttttttt 3720
 5 ttttttttgag acacagggtc ttgtctgtca cgtggactag agtacaatgg gcctgatcat 3780
 gggctcactg tagcctcgaa cacctgggct caagtaatcc tcccacctca gcctctttag 3840
 tagctgggac tacagcatga gccactgcc ttggctaatt tttaaattat tttttttag 3900
 agatggaaac ttgttatgtt gcccaggcta gtctcaaaact cctggactca agcgatcctc 3960
 ctaccttggc ctcccaaaagt gctgagatta cagtgtgac cacaccacac ctggccaaag 4020
 10 attggagtat ttttattgct attgtttgtc tgggtgggtg ggtgggtgta tgcctttag 4080
 ggacgtgtgt tgttgccaag ggctaaatca gtccctaccc tgcctgccac agtccctcac 4140
 agctttcctg ctctgtgaag ctaaggatac accccgatga taagctgtca acata 4195

15 <210> 44
 <211> 477
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

20 <400> 44
 tttttttttt ttttttttgg ataaagactt atttattatt tatcttatca tttcccagaa 60
 caaaggccat tgagtaagcc attcccttta aacttggttg ggcagctgtc acatggctga 120
 cctcttaatt acttcccaca gcccttgcca tgactgtggc catgcccacg tgggttgttc 180
 tcatgcagct tctcatgaca ggcaaagatc aactttgcca tcagcatcat acactcctca 240
 25 aagctcagct gattgtcctg gtttgtgtcc aggtcctcca tgatgtcatt tatgagggct 300
 tcattttctt tctctttctt cataaaagggt tgccaaactg tgcctccac catttggtct 360
 gaattccttc ttgtcagggt tgtagggng ggtcttctt cttaaagtat tgatgaaagg 420
 gggccagatg ggggggttat gctgcgtcc atctgaaaag tggctttggt gggccat 477

30 <210> 45
 <211> 406
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

35 <400> 45
 tttttttttt tttttttttt ttttggagga agagacttta tttggcccca gccctagcc 60
 ccacagccaa gacagtttga cataacaggc cccggggccc tgggtgggta gaggcagggt 120
 ggccctggcct cctgattagt ggctgtggcc gtggccacca tgactgtggc cgtggccggg 180
 40 gccactgtga tcttggccac tgtggtctta gggggtgccc tccccaggc ctggcttatg 240
 gtggtggcca gggcctcgt caccctcgtg cattttttcg tgggaggccc aggttagcct 300
 cgccatcagc atgatgaact cctggagctc agctgcttgt ctgcatttgg gtccaggtcc 360
 tccatgatgt gttctatgac cttttcattc ttattctctt tcttga 406

45 <210> 46
 <211> 425
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

50 <400> 46
 ggaggaagag actttatttg gcccagccc ctatccccc agccaagaca gtttgacata 60
 acaggccccc gggccctggt tgggttaaagg cagggtggcc tggcctcctg attagtggct 120
 gtggccgtgg ccaccatgac tgtggcctg gccgtggcca ctgtgatctt ggccactgtg 180
 55 gtcttagggg gtgcctctcc cgaggcctgg cttatggtgg tggccagggc cctcgtcacc 240
 ctctgtcctc ttctctgtgg aggccaggt tagcctcgcc atcagcatga tgaactcctc 300
 gaagctcagc tgcctgtctg catttgtgtc caggctctcc atgatgtgt ctatgacctt 360
 ttcattctta ttctccttct tgagaaaatt ttgcagatct tttcgacca gctcttngaa 420

ttccc

425

<210> 47

5 <211> 565

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 47

10 aattcgctcg gctttgacag agtgcaagac gatgacttgc aaaatgtcgc agctggaacg 60
 caacatagag accatcatca acaccttcca ccaatactct gtgaagctgg ggcacccaga 120
 caccctgaac cagggggaat tcaaagagct ggtgcgaaaa gatctgcaaa attttctcaa 180
 gaaggagaat aagaatgaaa aggtcataga acacatcatg gaggacctgg acacaaatgc 240
 agacaagcag ctgagcttcg aggagtcat catgctgatg gcgaggctaa cctgggcctc 300
 15 ccacgagaag atgcacgagg gtgacgaggg ccctggccac caccataagc caggcctcgg 360
 ggagggcacc ccctaagacc acagtggcca agatcacagt ggccacggcc atggccacag 420
 tcatggtggc cacggccaca ggccactaat caggaggcca ggccaccctg cctctacca 480
 accagggccc cggggcctgt tatgtcaaac tgtcttggct gtggggctag gggctggggc 540
 caaataaagt ctcttctctc aagct 565

20

<210> 48

<211> 430

<212> ADN

25 <213> Homo sapiens

<400> 48

gacttgagg aagagacttt atttggtccc agcccttagc cccacagcca agacagtttg 60
 acataacagg ccccggggcc ctggttgggt agaggcagg tggcctggcc tcctgattag 120
 30 tggctgtggc cgtggccacc atgactgtgg ccgtggcgt ggccactgtg atcttggcca 180
 ctgtgtgtctt aggggtgccc ctcccagagg cctggcttat ggtggtggcc agggccctcg 240
 tcacctctgt gcatcttctc gtgggaggcc cagggttagcc tcgccatcag catgatgaac 300
 tcctcgaagc tcagctgctt gtctgcatt gtgtccagg cctccatgat gtgttctatg 360
 accttttcat tcttattctc cttcttgaga aaattttgca gatcttttcg caccagctct 420
 35 ttgaattccc 430

<210> 49

<211> 305

40 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 49

tgacttgagg gaaaaaactt tatttgccc cagcccctag cccacagcc aaaacagttt 60
 45 gacataacag gccccggggc cctggttggg tagaggcagg ggggcctggc ctctgatta 120
 gtggctgtgg ccggggccac catgactgtg gccggggccg gggccactgt gatcttgcca 180
 ctgggtctct aggggtgccc ctcccagagg cctggtttat ggtggtggcc agggcccttg 240
 tcaccttgt gcattttttc gtgggaggcc cagggttagcc tcgccatcag catgatgaac 300
 50 tcctc 305

<210> 50

<211> 452

<212> ADN

55 <213> Homo sapiens

<400> 50

ggaggaagag actttatttg gccccagccc ctagcccccac agccaagaca gtttgacata 60

atagggccccc gggccctggg tgggttagagg cagggtggcc tggccctctg attagtgggt 120
 gtggccgtgg ccaccatgac tgtggccgtg gccgtggcca ctgtgatctt gggccactgtg 180
 gtcttagggg gtgcccctcc cgaggccctgg cttatggtgg tggccagggc cctcgtcacc 240
 ctgttgcatt ttctcgtggg agggccaggt tagcctcgcc atcagcatga tgaactcctc 300
 5 gaagctcagc tgcctgtctg catttgtgtc caggctcctc atgatgtgtt ctatgacctt 360
 ttcattctta ttctccttct tgagaaaatt ttgcagatct ttctgcacca gctctttgaa 420
 ttcgccctgg ttcagggtgt ctgggtggcc ca 452

10 <210> 51
 <211> 4439
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15 <400> 51
 atcactgtgg agtaggggaa gggcactcct ggggtggcaa ggtgggaggt gggccctgtg 60
 tccccacagt gggcagggag gtagtgaaag ggaagctggc cggacaggaa gggccattcc 120
 aagagggcct tgtgcgcagg gctaagccaa gctttctcca taggcaatgg ggagcaactg 180
 gaggttcgta gcaggagaag gacacatcaa gcccaccagg aggctaagta aaaacagttg 240
 20 tctcccaagt tataagttcc tggaaacctt gctgggagca ggatttagaa aaatgatgct 300
 gagagatgct agaaacatat tgcacctgag gctctctcac tcagactgca agaggaaggt 360
 atcatcagaa ttgcccttaa ccaggaaacca gaatagctgg gtcccccttc tgccaagtca 420
 gcaaccagct atgtgacctt gctcaggctc atctccgggt gtcagtttct tcatctacaa 480
 tgcaagaggg ttgcccacct ctgagaacct ttctaacccc aaatctcacc ctatgaatct 540
 25 aagaacacaa cccctcgcca tcctaagtat cacagagcca ggcaagcatg ggtgagagct 600
 cagaccatcc ttgttggact aaaaggaagg ggcagactgc catggggggc agccgagagg 660
 gtcaggcccc cataggtcct cagcctgctt caacctcaaa ggggatgggg ggctgagtgg 720
 tgccagagga gcagcaggct cgctcgggga gagttagggc ttaggataga agggaaatga 780
 actaaacaa cagcttctctg caaacaggtt tcaggccagg gctgggaatt tcacaaaaaa 840
 30 gcagaaggcg ctctgtgaac atttctctgc ccgccccagc ccccttctct gcagcattag 900
 cacactgtct acctgtgaag caatcttccg gagacagggc caaagggcaa gtgccccagt 960
 caggagctgc ctataaatgc cgagcctgca cagctctggc aaacactctg tgtggctcct 1020
 cggcttttgg aagtgaactg ccagcttccc caggcagaag cctgcctgce gattcctctt 1080
 ttcttctcct gacccaactt ccttccaaat cctcctccta gaagccctcc ttggttggcc 1140
 35 ctgectactt taaagcttct ttacatttt cttaggtcat gtccccctgg ggcctcctgc 1200
 cctcaaatgc tttgcttttt ggcactctgt agatattcta aaaaatcatt ttgtacatgt 1260
 gtgtgacagg ccatctccca gttaagtgc agcctgtgct ttctttttat ttgtcacttc 1320
 cccactatt tctgtgagtg cttagtagga agtgtcaaa aagcttgaca gcattttctt 1380
 ctaagtgtcc caactcttgg ttttccatta cacagacaga gtgcaagacg atgacttgca 1440
 40 aaatgtcgcg gctggaacgc aacatagaga ccatcatcaa caccttccac caatactctg 1500
 tgaagctggg gcacccagac accctgaacc agggggaatt caaagagctg gtgcaaaaag 1560
 atctgcaaaa ttttctcaag gtagggtctg actctggcag gtctgaccca gcctcaccgc 1620
 agtttgggtt gacaagggag gatgggagta tgggctacag caatcaaggg gaagatttga 1680
 gctcctggag cccagcccca agacgcagcg agtgctctgt tatacagggc aggtgctcac 1740
 45 agttacacag gacgacaggg tcaagaaatt gctcaattga acacctgcta tttgtcgggc 1800
 cctgttctgg gcagagggat gtagtggtaa atgggagccc actattccat gaggagacac 1860
 acagtaaagt tgttggccaa taaagagcac agataaagcc aaatgccaat aagtgcctgg 1920
 aagaaaatga gatagagtgc gctgtgggca atggggctgg gtgggggtga ggtgaccagt 1980
 tagggtagat gagaagggcc tctttagga ggtaacattt gagctgagcc ccgaatgttg 2040
 50 gggaggggag cccctgagga tgacacttgg cacaaagctg aggagaccct aagcctcagg 2100
 gcgaacttgg ggtggaagac ttgggggctt ttctaactct aagggtctgc ggtggaaaat 2160
 gaatgcataa agagcacatg gagagcactt gcacagcact cagggaactg ggaggttttt 2220
 cccccgctcc aaaaaatgatt aggcagttct aagaaaaagg ctgagcactt ccaacagcct 2280
 tttgttttc ttttcaaatt tgggaaagc cgggaaacag aggcctgcat taagaagggt 2340
 55 ggaacacatg ggtctcagtc tcagttccag tcccggagcc agacatcctg gggtaggtcc 2400
 ccagccctcc cagtgcctcc cctccgctt tggttaagggt gagaattgca gccttcagag 2460
 ttagggggcc tgacagctct ccataggtgg aggcctcagg caggcaggat gctgggtggg 2520
 gtaggcaaga aaggggccag cagagaggcc gcatacgaaa actatcctcc atgtgacccc 2580

ctatgcccgc ttcaccccc accctgacatc ccccaccaga agcaaagcga tgctgtggga 2640
 aaggaagcag agcctcatgg atgggctgca caggagagtg ctgcattgg ctgggtaccc 2700
 cacagggttct gggaggggac ttagcgaggt gactcagtg ctggcctcc caaagtgtg 2760
 ggattacaag catgagccac cctgtccgac catctccct tttatacttt atcacacct 2820
 5 tgagggtcagc ggagcacata ctctgtctct tgaccctcca tctccctgc ccacacctag 2880
 gtttttctag tgtttccccg ttgtattggt tgaaataaagt ttcactaatt ggtaacctcc 2940
 agaggggaagg gaagggaggg caggggaagg agtgaagtgc agaggggtag cagagtggaa 3000
 ctggcctcta agtcagatct gaatttgcac gccctcaata gtcaagcctg tgaaaactaa 3060
 tgaccctctc taggactggt ttcaagtctt cctccaggaa gataccatc ctagctgtta 3120
 10 aagttgttat aaggaccaa tgagggtgaca tttccaggct tactcatgcc atgaccaggg 3180
 caagaccctg gaactcagct tctcttctta taaatagaga atcagcacc aagtcacagg 3240
 gtcattggagg gaataaactg gagagcggtt ggtatgtgct cagtgtctgc tccattgtgc 3300
 gcactcagcc tatggtcatt tttaattttt aaatccagcc ccagggtcga ggcttccttg 3360
 tacatttgcc agctggtcac ttactgtgct ccagtcctcc acctctggcc acaccagct 3420
 15 ctacaggcct tctctcccca ccgcagaag gagaataaga atgaaaagg catagaacac 3480
 atcatggagg acctggacac aaatgcagac aagcagctga gcttcgagg gttcatcatg 3540
 ctgatggcga ggctaacctg ggctccccc gagaaagtgc acgaggggtg cgagggccct 3600
 ggccaccacc ataagccagg cctcggggag ggcacccct aagaccacag tggccaagat 3660
 cacagtggcc acggccacgg ccacagtcac ggtggccacg gccacaggcc actaatcagg 3720
 20 agggcaggcc acctgcctc taccacaacca gggcccccgg gctgttatgt caaactgtct 3780
 tggctgtggg gctaggggct ggggcaaata agtctcttcc tccaagtcag tgctctgtgt 3840
 gcttcttcca cctcttctcc aacctgcct tcccagggt ctggcattta gacagccctg 3900
 tctttatctg tgactcagcc cctcattca gtatttaaca aatgagaagc agcaaaacat 3960
 gggctgtgtg tgggcccctt ggctcacctc cctgacctg tctcacctc tgacttcagg 4020
 25 cccactgtt cagatcccag gctccctgcc ccatctcaga caccctgtcc agcctgtcca 4080
 gcctgacaaa tggcccttgt cactgtacac tgtagaaagc aaaaaggcat atctctaccc 4140
 cttgatatgc ctgtacctc accaaccagc cccaagcctg tcttcacca tcaactgtcta 4200
 cacagccctc tctctctct aacagaattc tattctctg aaagtcttca gaaactggag 4260
 ctagatagtg ccatgtcttg ggaggaaatc ggcaccaggc agtggaaca aggacagatc 4320
 30 ggtgtgttat ctcacatttg atcagagagc atgatctctc ttaacagacc tgccacccta 4380
 atcaacggga gtgctcacac aagtgggagt ctgagagctt agccctatgc ccacctgg 4439

<210> 52

35 <211> 565

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 52

40 aattcgctcg gctttgacag agtgcaagac gatgacttgc aaaatgtcgc agctggaacg 60
 caacatagag accatcatca acaccttcca ccaatctct gtgaagctgg ggcacccaga 120
 caccctgaac cagggggaat tcaaagagct ggtgcgaaaa gatctgcaaa attttctcaa 180
 gaaggagaat aagaatgaaa aggtcataga acacatcatg gaggacctgg acacaaatgc 240
 agacaagcag ctgagcttcg aggagtctat catgctgatg gcgaggctaa cctgggctc 300
 45 ccacgagaag atgcacgagg gtgacgaggg cctggccac caccataagc caggcctcgg 360
 ggagggcacc ccctaagacc acagtggcca agatcacagt ggccacggcc atggccacag 420
 tcatggtggc cacggccaca ggccactaat caggaggcca ggccaccctg cctctacca 480
 accagggccc cggggctgt tatgtcaaac tgtcttggt gtggggctag gggctggggc 540
 caaataaagt ctcttctctc aagct 565

50

<210> 53

<211> 255

<212> ADN

55 <213> Homo sapiens

<400> 53

gayaayggng aygntngyca rgaytgyath caratggtna cngayathca racngcngtn 60


```

mgnaacnaayw snaenttygt naargenhyth gtngarcayg tnaarqarga rtgygaymgn 120
ytngngneong gnattggcnga yathtgyaar aaytayathw sndartayws ngarathgcn 180
athcaratga tgatgcayat gcargaycar carcnaarg arathtgygc nythngtnggn 240
tcttgygayg argtn 255

```

<210> 54

<211> 2724

<212> ADN

10 <213> Homo sapiens

<400> 54

```

cgcgctatgt acgcccctctt cctcctggcc agcctcctgg gcgcggctct agccggcccc 60
gtccttggac tgaagaagt caccaggggc tggcagtggt ggtgccagaa tgtgaagacg 120
15 gcgtccgact ggggggcagt gaagcactgc ctgcagaccg ttgggaacaa gccaacagt 180
aaatcccctc cctgcgacat atgcaaagac gttgtcaccg cagctggtga tatgctgaag 240
gacaatgcca ctgaggagga gacccctgtt tacttgaga agacctgtga ctggcttccg 300
aaaccgaaca tgtctgcttc atgcaaggag atagtggact cctacctccc tgtcactctg 360
gacatcatta aaggagaaat gagccgtcct ggggaggtgt gctctgctct caacctctgc 420
20 gagtctctcc agaagcacct agcagagctg aatcaccaga agcagctgga gtccaataag 480
atcccagagc tggacatgac tgaggtggtg gccccttca tggccaacat cctctctctc 540
ctctaccctc aggcaggccc ccgcagcaag cccagccaa aggataatgg ggacgtttgc 600
caggactgca ttcagatggt gactgacatc cagactgctg tacggacca cccaccttt 660
gtccaggcct tgggtgaaca tgtcaaggag gagtgtgacc gcctgggccc tggcatggcc 720
25 gacatatgca agaactatat cagccagtat tctgaaattg ctatccagat gatgatgcac 780
atgcaaccca aggagatctg tgcgctggtt gggttctgtg atgaggtgaa agagatgccc 840
atgcagactc tgggtccccgc caaagtggcc tccaagaatg tcatccctgc cctggaactg 900
gtggagccca ttaagaagca cgaggtccca gcaaagtctg atgtttactg tgaggtgtgt 960
gaattccttg tgaaggaggt gaccaagctg attgacaaca acaagactga gaaagaaata 1020
30 ctgcagcgtt ttgacaaaat gtgctcgaag ctgccgaagt cctgtcgga agagtgccag 1080
gaggtggtgg acacgtacgg cagctccatc ctgtccatcc tgctggagga ggtcagccct 1140
gagctggtgt gcagcatgct gcacctctgc tctggcacgc ggctgcctgc actgaccgtt 1200
cacgtgactc agccaaaagga cgggtggctt tgcgaagtgt gcaagaagct ggtgggttat 1260
ttggatcgca acctggagaa aaacagcacc aagcaggaga tccctggctgc tcttgagaaa 1320
35 ggctgcagct tccctccaga ccttaccag aagcagtgtg atcagtttgt ggcagagtac 1380
gagccctgct tgatcgagat cctgggtggg gtgatggatc cttcctctgt gtgcttgaaa 1440
attggagcct gcccctcggc ccataagccc ttgttgggaa ctgagaagtg tatatggggc 1500
ccaagctact ggtgccagaa cacagagaca gcagcccagt gcaatgctgt cgagcattgc 1560
aaacgccatg tgtggaacta ggaggaggaa tattccatct tggcagaaac cacagcattg 1620
40 gtttttttct acttgtgtgt ctgggggaat gaacgcacag atctgtttga ctttgttata 1680
aaaatagggc tccccacct ccccatctt tgtgtcctt attgtagcat tgctgtctgc 1740
aaggagccc ctagcccctg gcagacatag ctgcttcagt gccccttttc tctctgctag 1800
atggatgttg atgactgga ggtcttttag cctgcccttg catggcgctt gctggaggag 1860
gagagagctc tgctggcatg agccacagtt tcttgactgg aggccatcaa cctcttgggt 1920
45 tgaggccttg ttctgagccc tgacatgtgc ttgggcaact gtgggcctgg gcttctgagg 1980
tggcctcctg cctgatcag ggacctccc cgcttctctg ggctctcag ttgaacccaa 2040
gcagcaaaac aaaggcagtt ttatatgaaa gattagaagc ctggaataat caggcttttt 2100
aaatgatgta attcccactg taatagcata gggatttttg aagcagctgc tgggtggctt 2160
ggacatcagt ggggccaagg gttctctgtc cctggttcaa ctgtgatttg gctttccctg 2220
50 gtctttctct gtgatgcctt gtttggggtt ctgtgggttt gggtggaag agggcccatc 2280
tgctgaatg taacctgcta gctctccgaa gccctgcggg cctggcttgt gtgagcgtgt 2340
ggacagtggg ggcgcgctg tgctgctctg tgttccctac atgtccctgg ctgttgaggc 2400
gctgttctag cctgcacccc tccctttgtc tcatagatgc tcttttgac cttttcaaat 2460
aatatggat ggcaagctcc taggcctctg cttcctggta gagggcgga tggcgaagg 2520
55 tctgtcgggt ttggttggg tgcctgggtg ttgggggttg aagctgtctg tggccactt 2580
gggcacccac gcttctgtcc acttctggtt gccaggagac agcaagcaaa gccagcagga 2640
catgaagttg ctattaaatt gacttctgta tttttgtttt gcactaaagt ttctgtgatt 2700
taacaataaa attctgttag ccag 2724

```

<210> 55
 <211> 2171
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 55
 10 cgcgctatgt acgcccctctt cctcctggcc agcctcctgg gcgcggctct agccggcccc 60
 gtccttggac tgaaagaatg caccaggggc tcggcagtggt ggtgccagaa tgtgaagacg 120
 gcgtccgact gcggggcagc gaagcactgc ctgcagaccg tttggaacaa gccaacagtg 180
 aaatcccttc cctgcgacat atgcaaagac gttgtcaccg cagctggtga tatgctgaag 240
 gacaatgccca ctgaggagga gatccttggt tacttgagga agacctgtga ctggcttccg 300
 aaaccgaaca tgtctgcttc atgcaaggag atagtggact cctacctccc tgtcatcctg 360
 15 gacatcatta aaggagaaat gagccgtcct ggggaggtgt gctctgctct caacctctgc 420
 gagtctctcc agaagcacct agcagagctg aatcaccaga agcagctgga gtccaataag 480
 atcccagagc tggacatgac tgagggtggtg gcccccttca tggccaacat cctctcctc 540
 ctctaccctc aggacggccc ccgcagcaag ccccgccaa aggataatgg ggacgtttgc 600
 caggactgca ttcagatggt gactgacatc cagactgctg tacggaccaa ctccaccttt 660
 20 gtccaggcct tgggtgaaca tgtcaaggag gagtgtgacc gcctgggccc tggcatggcc 720
 gacatattgca agaactatat cagccagtat tctgaaattg ctatccagat gatgatgcac 780
 atgcaaccca aggagatctg tgcgttggtt ggggtctgtg atgaggtgaa agagatgccc 840
 atgcagactc ttgtccccgc caaagtggcc tccaagaatg tcatccctgc cctggaactg 900
 gtggagccca ttaagaagca cgaggtecca gcaaagtctg atgtttactg tgagggtgtgt 960
 25 gaattcctgg tgaaggaggt gaccaagctg attgacaaca acaagactga gaaagaaata 1020
 ctgcagcgtt ttgacaaaat gtgctcgaag ctgccgaagt cctgtcgga agagtgccag 1080
 gaggtggtgg acacgtacgg cagctccatc ctgtccatcc tgctggagga ggtcagccct 1140
 gagctggtgt gcagcatgct gcacctctgc tctggcacgc ggctgcctgc actgaccgtt 1200
 cacgtgactc agccaaagga cggtggcttc tgcgaagtgt gcaagaagct ggtgggttat 1260
 30 ttggatcgca acctggagaa aaacagcacc aagcaggaga tctggctgc tcttgagaaa 1320
 ggctgcagct tcctgccaga ccttaccag aagcagtggt atcagtttgt ggcagagtac 1380
 gagcccgctg tgatcgagat cctggtggag gtgatggatc ctctctctgt gtgcttgaaa 1440
 attggagcct gccctcggc ccataagccc ttgttgggaa ctgagaagtg tatatggggc 1500
 ccaagctact ggtgccagaa cacagagaca gcagcccagt gcaatgctgt cgagcattgc 1560
 35 aaacgccatg tgtggaacta ggaggaggaa tattccatct tggcagaaac cacagcattg 1620
 gtctttttct acttgtgtgt ctgggggaat gaacgcacag atctgtttga ctttgttata 1680
 aaaatagggc tccccacct cccccatttc tgtgtccttt attgtagcat tgctgtctgc 1740
 aagggagccc ctgacccctg gcagacatag ctgcttcagt gcccccttct tctctgctag 1800
 atggatggtg atgcactgga ggtcttttag cctgcccctg catggcgccct gctggaggag 1860
 40 gagagagctc tgctggcatg agccacagtt tcttgactgg aggccatcaa cctctctggt 1920
 tgaggccttg ttctgagccc tgacatgtgc ttgggcaact gtgggcctgg gcttctgagg 1980
 tggcctcctg cctgatcag ggaccctccc cgctttcctg ggccctctcag ttgaacccaa 2040
 gcagcaaaac aaaggcagtt ttatatgaaa gattagaagc ctggaataat caggcttttt 2100
 aaatgatgta attccactg taatagcata gggatttttg aagcagctgc tgggtggctg 2160
 45 ggacatcagt g 2171

<210> 56
 <211> 35465
 50 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 56
 55 gatcttggct cactgcaacc tccgcctcca aggttcaagc gatectccca cctcagcctc 60
 ccaagtagct gggattacaa gcgtgtgcta tcacacctgg ctaattttta tatttttgg 120
 agagatgggg ttccacctg ttggttaggc tggctctgaa ctctgacct caggtgatct 180
 gcctgcctca gcctcccaaa gtgctgggat tacaggtgtg agccaccgcg cccagcctga 240
 ccttttcttt ctctactggc aaaactcctg ctctttttta aagccaagct catgtcacct 300

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55

```

ccccctgaa  gtccctcgtg  actccccaa  cggctcagtg  ctctctcgt  tgggctcccc 360
ggccccctg  ctgctctcca  tcacaccctg  accactctgg  gcagtggtcc  cccctccccc 420
ccactgacta  tgggctcctt  gaaggcaggg  cctgggtctg  ccccatctct  gtgtccccag  480
caatgctggg  catgagtcag  cctcagaaga  catctgctga  atggctgcaa  accagaggaa  540
atatctccag  cctcaggtct  ggacccctcc  cctctctctt  cccacctctg  acttcatacc  600
actcaccctc  cagagtcttc  aatgcccact  attacttcac  acagtggccc  tgtgacaggg  660
aatcagggtc  tctgtccacg  ctaccaggtg  tttcatgtct  actgtgactt  ccaggaccac  720
aagccctttt  gcgcccacca  tgtcttcacc  taagagatct  tcaaagcccc  gtatgtctct  780
ggcaccctgt  ggatcctcca  tgcctcactg  ggatcccaag  cctctctgct  ccttgaagtc  840
caccaaaatc  gcaacaccca  acagatcctt  agtgcccacc  aaaccagcga  catcccgtaa  900
ctcagtcctg  agcccaagca  gttccaagtc  caccaaaatc  accagtacaa  aaagagcccc  960
ttctaacctg  cccagcagca  ggtcccaggt  ccgcagcaaa  gcaagaacac  ccagcagggt  1020
gagcaccgac  accaggacca  gcaaaagccg  caaggccagc  gacgtgagat  gccaccagcg  1080
gagggggaca  cacagccggg  ctaggacacc  tggcagaagg  ggaagccgca  gctccaagag  1140
gtcaccagac  agggccagca  ctctggcag  gataagaact  catggtgcca  gaccaggcat  1200
ggccagcagg  gtgagaactc  ccacttcaca  gcaaaaaggg  agccggggaa  agagtacgg  1260
ccggcctaga  accagcaaca  gggaaaggag  tgacagccag  cctagaaatc  tgagcaagaa  1320
gagttaccgc  ccaccaggag  gctcaggtat  agggaggagt  tccgagctgg  ctgtaactcc  1380
cagtacagcc  aagtgtcaaa  ccccgactgg  aattccctcc  aaggagaaga  gtgacaacct  1440
atctccatcc  tcatcaagga  aggtgaagag  ctacggtcag  atgatcatcc  ccagtaggga  1500
aaagagttac  agccccactg  aaatgtccag  cagggtcaag  agttataacc  aggcagcac  1560
ccgcagcagg  ccgcaaagtc  acagccaatc  tagaagcccc  agaaggtcaa  gaagtggcag  1620
tcagaagagg  acgcacagca  gagtgagaag  tcacagttgg  aagagaaacc  atagcagggc  1680
aagaagtcgc  acccggaagg  gaattctgag  ccagatggga  agacacagcc  agtctagaag  1740
ccacagcaag  gggaaaagtc  aaaaccaatc  tagaaccctc  agaagaggaa  gaagtccaaa  1800
ctggctctga  aaccccgaca  aggaaagaag  tcatagccat  tccagaagct  ccagcaagaa  1860
gagagatcac  aggggatcta  gcagcccgag  gaaggagagt  ggtcgcagtc  aatcagaaag  1920
ccccaacaag  cagagagatc  acagccgatc  tagaagtccc  aacaaggcga  gagatcgag  1980
ccgatctaga  agtccctaca  aggcgagaga  tcgcagccga  tctagaagtc  ccaacaaggc  2040
gagagattgc  agccgatcta  gaagtcccta  caaggcgaga  gatcgagcc  gatctagaag  2100
tcccaacaag  gcaagagatc  atagccgatc  tagaagtccc  aacaaggcga  gagatcgag  2160
ccgatctaga  agccccagca  aggaaagaga  tcacagccaa  cttggaagcc  ccagcaagaa  2220
gagagatcac  agacgatcta  gaagcccgag  caaggagaga  cagtgcagac  aatctagaag  2280
ctccagcaaa  gagagagatc  acagacgatc  tagaagcccc  agcaaggaga  gacagcgag  2340
acaatctaga  agccccaaca  aggagagaga  tcgcagccaa  tctagaagcc  ccagcgagga  2400
gagagagcac  agacaatcca  gaagcccgag  caaagagaga  gatcgagac  gatggagaag  2460
ccccagcaag  gagagagagc  gcagacaatc  tagaagctcc  agcgaggaga  gagatcacag  2520
ccgatctaga  agccccaata  agcagagtgg  ttacagtcca  cctagagcct  ccagcaagga  2580
gaaagctcat  agccgatcta  gaaccccgag  caaagaagga  aatcatagcc  aatctagaag  2640
ctctagcaag  gagagcgacc  ccagtccaat  tcagctcccc  agaagtcccc  actggaagag  2700
atccctact  aggacaagca  gtctcagtc  gaatagaacc  cctagcaaga  caagcagcca  2760
ctccccatca  acatttccca  gtgggggcca  aaccctaagc  caggatgaca  gtcaagccga  2820
cgccaccacc  tctaaggcca  ccttacctgg  ggaaaggctt  tcatcatctt  ctccaagct  2880
ggcgtagccc  ccagtctcag  ctggctcag  ggtctctgtc  atgaccgggg  gaggggacag  2940
gagacaggag  cagagcagca  gctgagcagc  gtcctctccc  ggccagctct  ccacagccac  3000
acctccggcc  acaagtcttc  taatacagga  ttgtggcagg  tagagaggga  tgctggatag  3060
ggggaaaagga  aagacctgtg  atgattcaat  aaatttttac  atagcaccac  tccccacca  3120
gccccactgt  gtgtcactg  ctggcatggg  gcacagagga  ccccgactct  gtccctgact  3180
gtctacaggg  tcttgactgc  aagccctgcc  cctctctagg  tctttttttt  ttttgagaca  3240
gagtcctctt  ctgttgccca  ggctggagtg  cagtgggtgt  atctcagctc  actgcaacct  3300
ccacctccca  ggctcaagca  attctcttac  ctacagcttc  cgagttagctg  gaactacaag  3360
tgtgcgtctt  cacgcccggc  taattttgta  tttttagtag  agatggggct  tcacctgtt  3420
ggccaggctg  ggctcgaact  cctgacctca  ggtgatccac  atgcctcaac  ctgcgaaagt  3480
gctgggatta  taggcatgag  ccaccgcacc  cgtcccccct  tctagggtctt  aatttccgca  3540
tgtgggcaac  aaggctgcct  tctggttctt  attcagtggt  gtagggagag  gtgacactcc  3600
aaatattcaa  cagtggggac  tgggtgtggc  accaatcaga  actgagagtg  gagcgggacg  3660
gataccaggc  cttaaccctt  tagttgctgg  accatgggga  ggtctgggg  tggggaaagt  3720
ttatggggaa  aaaaaacctt  caaactgtgt  ttttctctta  ctctcacact  atcacaacaa  3780

```

| | | | | | | | |
|----|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| | tcatacaacac | agaattctgt | gaccaaattgt | gtggggcttt | ttccccacac | actacacagc | 3840 |
| | agacaacagc | taggtgtccc | ctccgattcc | attccaaacgc | tgtccccaca | cccagctaata | 3900 |
| | ttttgtattt | ttggaagaga | cagggtttca | ccatgttgcc | cagagctcaa | gcaatctgcc | 3960 |
| | cacttcagcc | ctccaaagt | ctgggattac | agggctgagc | caccacaccc | gactttttta | 4020 |
| 5 | aaaaaataaa | aataaggccg | ggcgagtgga | cccatgctg | taatcccagc | actttgggag | 4080 |
| | gcccaggtgg | gcagatcacc | tgagctcagg | agtttgacac | cagcctaggc | aacatggcaa | 4140 |
| | acttgtctct | aaaaaaaaaa | aaaaaattac | aaaagttagc | cggtgtgggt | gcatgtgctt | 4200 |
| | atagtcaccg | ctacctgaga | ggctgaggca | ggaggataaa | ttgagcctgg | aagggtcaagg | 4260 |
| | ctgcagttag | ccgtgacctt | gccactgcac | tcaagcctgg | atgacccatc | ttacaaaaaa | 4320 |
| 10 | aaaatttttg | ctggagctgc | tcacagaact | caaggaaatg | cttacttaga | tttactgggt | 4380 |
| | tattatagag | gatattgcaa | agaacaaaga | tgaagagatg | tgtaggggcaa | ggtataagggt | 4440 |
| | aagggggcagg | gagcttcacg | ccctccctgg | gggtgctacc | tacaggaacc | ctcaggtgggt | 4500 |
| | tagctatgctg | gaagctctcc | aaacccagtc | ctcttgggtt | tttacggagg | ctttaagaca | 4560 |
| | gcagcattgg | gcatggactt | ctctgaaaag | tgtcttaaga | ccaacaatca | agaaggtggg | 4620 |
| 15 | gaagattaga | gtcttgccct | ggggcaggaa | atggaggggc | ggaggagggtc | agagagattc | 4680 |
| | tgttttctca | gacctgcccc | aggcctaagg | tacacaacat | tataacaaga | gactgttaaca | 4740 |
| | aaggctgtag | gagttaccag | ccaggaactg | tggatgaaaa | ccaatatatt | tatatatata | 4800 |
| | ataccacaag | gggggtccaa | agtggcagtt | agggacaggg | agtacttgtg | tagcagtgac | 4860 |
| | acaccaaccc | atctggaagt | attttaatat | ttaaacaatt | ggtatggcta | tactagtttg | 4920 |
| 20 | tgattatcag | ccttagttct | gtatcaattg | gcaagatagt | gtctagggtt | gccacactct | 4980 |
| | agctgtgtag | caccaagcaa | agaacttaac | tctcttagcc | tgtttcttct | tctggaagaa | 5040 |
| | aggggtcttc | aggccttaac | tcacgtactc | cccataacta | gactgggaat | tactctcttt | 5100 |
| | gtacagatga | ggaaacagac | acagagggtga | taagttagta | gccccagggtc | accatctggt | 5160 |
| | aagtggatga | actaggattg | gaagccagac | ctttcataaa | atgatttctc | agctcaaaag | 5220 |
| 25 | gtttttctga | agattcagta | ggctcactga | tagaaattgc | tggtgtgtgg | ctgggtattcc | 5280 |
| | atcaagagtg | gccattacta | ctcccccccc | tgccctctca | taaaactccag | atgttccaga | 5340 |
| | cctctcatct | ctccctgtgc | acacaaggcc | ttttcacatc | tgtgggtctt | agtacaccca | 5400 |
| | ctgttgctgt | caagaatgtc | ctcctctctc | tttttttttt | tttttttgag | atggagtctc | 5460 |
| | actttgttgc | ccaggctgga | gtacagttagc | gcgatctcag | ctcactgcaa | cctctacctt | 5520 |
| 30 | gcacagcct | ccctagtagc | tgggattaca | ggcagccacc | accaccatgc | ccggctaatt | 5580 |
| | ttttggattt | tttagtagag | acagggtttc | attatgtcag | ccaggctgggt | ctcaaactcc | 5640 |
| | tgacctcagg | tgatccattt | accttggcct | cccagagtgc | tgggattaca | ggcaagagcc | 5700 |
| | accacgcccc | gcctctcttc | cccccttttg | gcctggagaa | ctccttttca | cccttcaaag | 5760 |
| | cccaccacaa | acataagaac | ctctataact | cttgcccgtc | gaaatactgc | ctctgccagg | 5820 |
| 35 | aagccttctg | tgacttctct | ctctccctct | tcaccaacgg | accgcccccg | ccccccacca | 5880 |
| | acccccaccac | acacacacac | cactactgtc | ttccactgta | ctccctgaca | gtagagaacc | 5940 |
| | aagcagggcc | agttgatgca | gcctcagcta | tatctcttac | atgccaaggc | ccatgcactg | 6000 |
| | gggatacaat | ggtggaaaat | acatggtccc | ttcaaagtct | ggatgtcaag | tttaattgctg | 6060 |
| | gggactaaag | agaaaagctt | cagattgaaa | cctggagggtg | gctggggcaa | aggaccattg | 6120 |
| 40 | gcacatttgg | cagggcaact | tcttaaagaa | agcacctaaa | tcttggcttt | taaagacaga | 6180 |
| | tttcataatt | ggcagaggag | aattctaatt | ataccctatt | gcctacaggg | ccccatctaa | 6240 |
| | tttgggaatt | ctactttata | ccaagataag | attgccagat | ttagcaataa | aaaacagaag | 6300 |
| | acatccaatt | aatttttttg | tttgtttttg | ggtttttgtt | gcggagatgg | tgtctcacta | 6360 |
| | tgttgcgaag | gctgtgttca | aattcctggc | tcaaaacaatc | ctcctgcctt | ggcctccac | 6420 |
| 45 | ttcccaaagt | gctgggatta | caggcatgag | ctaccacacc | tggcccttat | ttattttatt | 6480 |
| | atttaatttt | cttttttggg | acggagtgtc | actctgtcgc | ccagggttga | gcgcagtagc | 6540 |
| | gcgatctcgg | ctcactgcaa | cctctgcctc | ctgggttcaa | gcgattatcc | tgccccagcc | 6600 |
| | tcccaagtag | ctgggactac | aggcgcgtgc | caccatgcc | ggcttttttt | tttttttttt | 6660 |
| | tttttttttt | gagacggagt | cttgcctctg | cgccaggct | ggagtgcagt | ggcacgatct | 6720 |
| 50 | cggctcactg | caagctccgc | ctcctgggtt | cacgccattc | tcttgcctca | gccttccgag | 6780 |
| | tagctgggac | tacaggcgcc | tgccaccacg | cccactatt | ttttgtattt | ttagtagaga | 6840 |
| | tgggggtttca | ccgtgttagc | caggatgac | tcgatctcct | gacctcgtga | tccacccgcc | 6900 |
| | tcggcctccc | aaagtgtctg | gattacaggg | gtgagccacc | gcgcccagcc | tacttattta | 6960 |
| | tattttttta | gagacaggg | ctcgtctcag | tgcccaggct | ggagtgcagt | aggggtgatct | 7020 |
| 55 | gtaggaaagg | ggcttccagg | ccttaactca | tgtactcccc | cataaccagg | ttgggagggt | 7080 |
| | agctcactgt | aacctcaaac | tctgtgtctc | aaggtaacct | actagccct | aggagagcag | 7140 |
| | ctgggactac | aggtatgcgc | caccatgcc | ggcttaattt | ttactttttt | tttttttttt | 7200 |
| | tttttttgta | gagacggggg | tctcactata | ttgcccaggc | tggtcttgaa | ctcctgggtc | 7260 |

| | | | | | | | |
|----|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------|
| | caagccatcc | tectgectta | gcctcccaaa | gtattggtat | cactgcaact | agcccaaaaga | 7320 |
| | attaatatag | ctatgttcca | tgtgatattt | gggacataact | ttctctaaaag | gttgtatctt | 7380 |
| | tgggatataa | ttgtttatct | gaaattccaaa | tttaactaga | cattgtatat | tttataccggc | 7440 |
| | aaccacacac | ctgggacaat | caagacattc | cctgaagtta | ccaggagaca | atgcccatca | 7500 |
| 5 | gcctacactt | ttccaagccc | acgtcacaca | aggccctctc | cagagtattc | cagacgtcag | 7560 |
| | gtagggccat | cccttgggtc | acaagtccca | ctectaccac | gcctatggca | gccaaactga | 7620 |
| | aaggcaaaaca | cagtgcctgga | gaccccacaa | tgccttgggc | ctatagcagt | caattcccaa | 7680 |
| | gatccccccg | gtgaacacaa | taggcaccgc | ttccaatgct | cgagcaaaaga | gaccaggcca | 7740 |
| | aaaccttcca | ctacgggaca | ataacggcca | gttcccacaa | ttcgttgtgg | cagttcttcc | 7800 |
| 10 | caggatgect | taggectata | gcgaccacct | tcccagactc | cccgtgtgga | agcgtcccaa | 7860 |
| | gcctccagga | cggtcagcgg | caggtgtggg | ataaaaggaa | ccggtctcga | caaggatctg | 7920 |
| | ggacactctt | tcccaggatg | caccaggcct | acgactagcg | gaccgactcc | cacagcgctt | 7980 |
| | caaggcggag | cgctcgggtc | tcccaggatg | ccccaggggc | gcacaaaacgc | gtagggggag | 8040 |
| | aaaaagaagc | cctcgggtca | ccacggcccc | agaccgcggg | ctccccgggtg | acgggagtcg | 8100 |
| 15 | tcgtccccct | catgcagcgg | ggcgttagcg | cccgcttccc | ggcatgcctc | gcgcacccct | 8160 |
| | gcccgggaca | ctcaccggcg | ccggcgggcc | ccgctccggc | tctgcggcgg | cggctgcacg | 8220 |
| | cccagcctct | gcgectgcgt | cgcaagttag | gtaggacagc | gcgcaggggg | cgtgaagagc | 8280 |
| | ctagggcgct | tgcgcggcga | gacggactag | tectgtagcg | ctgtgggaag | aggggctatg | 8340 |
| | cgcgtcgggc | cgctgcagcg | acccgcgcgg | ggggcgccgt | gctttgcccc | tcgctgcctg | 8400 |
| 20 | ggtttacttg | gtacagcccc | cggcccaaaag | gaacaagaag | ctgaagggtt | cgcgcgtgcg | 8460 |
| | tgtcgggggc | aggaacgcgc | cttacaaaaac | tgggatgcgc | tgggggtgga | gggcgctagt | 8520 |
| | tcggactgga | tcctgggccc | gaggcctgct | tatttgcata | atcctagcgc | gggacaatga | 8580 |
| | aaggcctccc | gcactggaag | gagtgtattg | catattcccc | ggaggggcct | tactccagag | 8640 |
| | cgcagtgtat | agcatatggc | gggggcaacc | tgagcaaaag | gcctgcgcgc | agggactgca | 8700 |
| 25 | gactgacgcg | aagtgggtag | ccttgtcttc | gtaggggatc | agtttgcctc | ctgagagagg | 8760 |
| | gcacgagggc | caggacccct | cccaaccagg | ataaagggtt | attgatctcc | taggtgtcag | 8820 |
| | gccccatgct | ggcggattct | gtggtttctg | cagtgaacca | tactcctgta | ctcacggcac | 8880 |
| | cccagtcgaa | ggagatacgc | acctaatag | acaactacta | cccagaaggt | cagacctgga | 8940 |
| | gtgaggaaca | cagggggctg | tgggagccta | agaggcgctt | gccccggcct | ctggttctag | 9000 |
| 30 | aaagacttcc | aggaggtggt | gacctttaag | ccaagtacga | ataggagcca | actagaatgg | 9060 |
| | gaatgggtct | ggcagaatga | actgcaagcg | ccaaggccca | gaggccaaaa | aaaaaaaaaa | 9120 |
| | aaaaatagaa | gcgcattgtt | tgattgagga | agcaagagca | gcttagtatg | cctagaacct | 9180 |
| | aactggagac | gggaaatggt | tctatagacg | atggttagagt | tcaactatgg | ctacattcca | 9240 |
| | gtcttccctg | aagtgaactt | gtcacattct | ggcttaaaac | tcccccaaaag | ggatccccatt | 9300 |
| 35 | aggaaaaaaa | aaaaatccaa | aaatctttat | catggcctca | gggctataca | cctggtcttg | 9360 |
| | ccgtgcttat | ctttctgacc | ccacctactt | cctcctccct | ccatttctgt | ccagctccac | 9420 |
| | cttaccoccaa | actctttacc | agctcggggc | tctgctcttg | ccgttccctc | cgctgaaaaa | 9480 |
| | tgcttttccc | tctgaccttt | gaatacctac | tcttgtgctc | accattcata | tcttgggtaca | 9540 |
| | gatgtcaatc | tgagaggctt | ttcctgatct | ctccataata | gcacttacac | atttgactgg | 9600 |
| 40 | agttatggat | aaatcgggat | tggccatgag | ttggtggtgg | ttgttaactgg | catgaagagt | 9660 |
| | acatggggct | gggcgcgggtg | gctcacgccc | gtaatcccag | cactttggga | ggccgaggct | 9720 |
| | ggtgtatcac | ctgaggtcag | gagcttgaga | ccagcctggg | caacatgggtg | aaaccctgcc | 9780 |
| | tctattaaaa | ctacaaaaat | tagccagggg | ttatgggggg | tgctgtaat | ccttgcctact | 9840 |
| | tgggaggctg | aggcacgaag | atcacttgaa | ccctggaggc | agaggttgca | ttgagtcgag | 9900 |
| 45 | attgagccac | tgcactccag | cctggggccac | ccagcgagac | tctgggtctc | gcctgtaatc | 9960 |
| | ccagcacttt | gggaggccga | ggcggggcga | tcacgtcaga | agatcgagac | catcctggcc | 10020 |
| | atcctagacc | atttctacta | aaaatacaaa | aaaaaaaaaa | aaaaaattag | ccgggcgtgg | 10080 |
| | tggcaggcgc | ctgtagtccc | agctactcgg | gaggctgagg | caggagaatg | gcgtgaacac | 10140 |
| | gggaggcgga | gcttgcagtg | atccgagatg | gcgctactgc | actccagcct | ggcgacaga | 10200 |
| 50 | gcgagacttg | gtctcaaaaa | aaagagtaca | tgggacgtta | ttgtcctgtc | tactcctgtg | 10260 |
| | ggtttgaagt | tttccataat | gacaatggca | taccacatca | ccatactctg | catttatatt | 10320 |
| | aatagttctt | atcacaatct | gaactttctt | tgcttccctg | ttttgagtgt | tttccctcatg | 10380 |
| | aaagcttcat | gagggttaaga | atggagtgcg | cctttttcac | tttgggttct | caatgcttag | 10440 |
| | agcaggatca | gatttcagat | tagtgtagcg | ctgtctttaa | cacttaacat | ttgcctgttt | 10500 |
| 55 | tattcaccat | ggactctaga | actttgagca | gcacctggca | catcgtaaga | ggttattttt | 10560 |
| | taaagttaga | ataatacatc | taaaatgtac | atgaatgaat | gagaggcctg | ggatgccaga | 10620 |
| | ctaaagagct | ttgacttggt | ctaaaggtga | tggggagcta | ggcaaagggt | ttgagagttt | 10680 |
| | aactttaatt | caaagttccc | ttggagacta | atgtctgggg | tagggggaag | ccagggttaag | 10740 |

| | | | | | | | |
|----|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------|
| | gggtccggggcc | atggaatggg | gtagctcagt | cgctatcaaa | aagacaagac | tgtgactatt | 10800 |
| | tggtctgaaga | aatggccaaa | cccagggttc | tggggaggte | gaggtaccct | cagtgaagtc | 10860 |
| | aggaccttct | cctggcctat | actgtccacc | agcaaccatc | acactcctcc | ctccccctct | 10920 |
| | ccttagttcc | cctcccaatg | gtacagccct | tgacagcagg | acagacacac | agccacccca | 10980 |
| 5 | aacacttggt | ctctccctcag | tttaatggtg | gtagtgaga | ttgccaaacc | ccctccccat | 11040 |
| | tccccctccc | accccgctaca | aaatgtgtgt | gtgggttttt | gttttttgtt | ttttgttttt | 11100 |
| | taacaagaaa | aagggggcaa | aagccaggaa | tggggagagg | ggggtgcaat | ctgatatttt | 11160 |
| | catacagact | tttgattttt | taatatatta | tatataaaac | catgaagacc | acgaatcctc | 11220 |
| | cccaaaactcc | tttccccctc | cccggggggc | ctggaggaga | gatgggggag | gcccccccag | 11280 |
| 10 | gagtggtgg | acagagagac | aaatatggat | gggacagacg | ttgggggaga | aggtagagag | 11340 |
| | aaggggagcc | caggaacctg | gggaaggggg | attggagaaa | agggttgggg | ctgtctccct | 11400 |
| | cactgcccc | atcaaagtta | tgacacaaag | acacagaatc | cctatttcca | cgccctcccc | 11460 |
| | ccaccatccc | ccccaccgtg | caaacatggc | tttgc aaaga | agtgc ccaga | gctctgtgga | 11520 |
| | actcttaca | tggctggcat | ggggtctagg | acccccaaag | aaatctgtgt | tccccctccc | 11580 |
| 15 | tgcccccccc | acccttcccc | gaaactgacc | ccctccccac | aagacctggt | tttgtagcct | 11640 |
| | agggggccctg | gccttcccc | agttatcttc | ccccaaccca | atccctactg | ccctcactgg | 11700 |
| | acttgggggg | tctggacctt | tggccccctg | cccttggggg | acccagacct | ctggggccctc | 11760 |
| | acttctggcc | cttacagaga | tccaggcatc | caacaccccc | atccctgccc | aagcgtctga | 11820 |
| | ggtgttagtg | gtggggggag | aagccacca | tcccagactc | tggtaaatgt | cttgctggt | 11880 |
| 20 | tccttgccagc | tggcagtggt | ggggacccca | gcccaggccc | aggcctaggc | ctgggggtggg | 11940 |
| | gatagggtca | gatgaagaat | tcctctttcc | tcttgtgtcc | gtcgttgcca | ttgaggaagg | 12000 |
| | cttctcttgc | ttctccctgt | tcataccaagc | cactggcttc | gtgggtcaga | taggaacctg | 12060 |
| | agggggtgac | agacccccgg | ggcagggggg | acatatattgt | ggatccagga | gttggacaga | 12120 |
| | agtataagggt | aagagggaga | cagacaagac | acatgccagg | cgaaggaaga | gggagaaacg | 12180 |
| 25 | gaacacacag | ggagaggcag | agaaaagggt | aaacagtggc | agagaaagag | gtaaaagcag | 12240 |
| | aattaggaag | actccaaaag | ctcaccgaaa | gtgccaccct | tatcctttct | cttggaggta | 12300 |
| | tttccctgcc | ctgctccccg | cgaattcagc | aattaggaag | ataaattggt | ttattcaaat | 12360 |
| | ccatgctctt | ttttccct | aattttttgt | atttttagta | gaaaaggggc | tgcgccatgg | 12420 |
| | tgcccaggct | ggtctcgacc | tcctagcttc | tcaagtgtct | tatccgctt | ggcctcccaa | 12480 |
| 30 | cgtgctggga | ttacaggcgt | gagccaccgc | gcccacccgc | aaatctatgc | ttttaattca | 12540 |
| | gcttctaaat | tctacccctt | ttcgagtatt | gtgccgaaag | ccccgcccc | tttgtcatct | 12600 |
| | ccgcccccg | tgcggcgga | tttggaatcc | agagcctagg | ctccgcccct | tcgttaccct | 12660 |
| | ggctctaggc | cccgcctctt | tccgagccct | acaaccaacc | aaccgtagag | tccaggcccc | 12720 |
| | gtcccactca | cccttctgcc | gtaccgagca | ccagaccatg | cccactagca | cacatatgat | 12780 |
| 35 | cagaaacacc | agcagcgcca | ggatgcccgc | cacaatggca | tagggaaccg | acgtctgagc | 12840 |
| | ctctaccacc | gcaccagggt | ctgccagagg | gacacggcac | aggaccagg | catcagagga | 12900 |
| | cgatcccagt | ctggcccat | cgctgccaa | cttttaagcc | attctgcaca | cgtctaaccg | 12960 |
| | tgccttttta | tgtgccacac | ccctcaaaaa | ttactgccac | ctttagtct | cttctcttct | 13020 |
| | cagatgcttg | ttggtttgta | cactgcccga | ccctccccct | gagtcatgtt | acattttcct | 13080 |
| 40 | tttcttttct | ttgttttctt | ttgcagagac | gggggtctca | ctatgtggcc | caggetgac | 13140 |
| | ttaaactcct | gggctcaagc | gatcctccgg | cctaggcctc | ccaaagtact | gggattagag | 13200 |
| | gctgtagcga | ccgcacccag | ccatcccttt | tcttttgact | caagtttctt | cctccactaa | 13260 |
| | gaaacagagt | ccaagaaaca | ggtccaagtc | ccttcccacc | ttgtctaaaa | cgctccaagt | 13320 |
| | atttaaagt | ctgggcccac | ctacccaaat | ttctgcccc | ccgtcataga | gctaaacaca | 13380 |
| 45 | gaacagctgt | gtgctagagc | ccattccaac | caccttacat | atttagttca | cataatcttc | 13440 |
| | acaacagcct | tgttatatag | gtgctattgt | ttatttccac | tttactgatg | ggtaaactga | 13500 |
| | ggcgagaca | ggttcggtta | cctgcaatag | aatgcagcca | acccgaattt | gagccccgcg | 13560 |
| | ggccagctctg | gtcccaaaac | aaaaagaact | ctgttggtcg | ccgaacccct | gagttatgtg | 13620 |
| | gcctctttgc | tcaagccccg | cccccgccac | ctggcgcccc | gcccccgccc | tcagtcggcc | 13680 |
| 50 | gcagcctgct | ctcaccgtag | accacaagta | cgtagagcgc | cctcgcatgg | ccgtgcttat | 13740 |
| | tggacgcctc | gcaagtgtag | gtgccgttat | ccgcggatac | cagacccggc | agcgtgagcg | 13800 |
| | tctctccac | ggcctccgce | ctctccggca | aagactcatt | cccgcggttc | cagcggatct | 13860 |
| | ggtttggcct | gggtggggat | aaagtatagt | gagagttagg | aaccgagggtg | ccagcaccca | 13920 |
| | attctgactt | gtcaagaatc | tagacatgca | actctcatcc | cgcagggacc | tccaaataag | 13980 |
| 55 | aggcttccctg | ctatctcttt | cctttctgga | aaacacacag | tccctgggct | acttccaccc | 14040 |
| | atcaccaagg | tctcaggaat | tctagccag | gctgaacatg | gtggcttatg | cctgcaatcc | 14100 |
| | cagcacttta | ggaggtgag | acgggaggac | tgtttaaggc | cagcagttcc | agaccagcct | 14160 |
| | gggcaacaca | gggagacccc | gtcactacaa | ttaaaaaata | ataataataa | taataataat | 14220 |

| | | | | | | | |
|----|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------|
| | tctagccctc | ccacccatt | ccatccctag | caaccaggag | tctgaggctg | cacagcttca | 14280 |
| | gtattgggga | gtctgagcct | ccagattcct | cctccctcag | gatccaggag | tccaggctcc | 14340 |
| | aatccctat | tccgcccagg | ccccagctct | ctccctctca | ggacccaggga | atccagggtcc | 14400 |
| | tagctccctg | tttgtccagg | tcttcagctc | tctccctcct | aggacccagg | agtcccaagtc | 14460 |
| 5 | cctgggtccct | gttcttccag | gtcccccagct | ttctccctcct | gaggacgcag | gaggccccca | 14520 |
| | gagctccact | gggggtccccc | gtgacagcac | acgtcaaacac | cagcgtgtct | ccctccctca | 14580 |
| | ccacagcttg | ggaggcatga | atccgggccc | tgggggagtc | tgttaggcaa | aagtaagagg | 14640 |
| | agagagtagt | ttccaagcca | tcacgcagga | caagggggac | cctcgcgggt | gcgggtggct | 14700 |
| | ggcgttggga | tcccttgggt | cctggcccgc | cggtcactta | cactgcacat | ccagcacgta | 14760 |
| 10 | ctgctgtctg | ttgctgtgtc | cggagggcag | cgctcgttct | tgcgcctcac | agatgatgat | 14820 |
| | accaccgtcg | tccctacggt | ccacacgaaa | ccgtactgtg | cttgccacgc | tccagacctt | 14880 |
| | gccattttcc | tggctgtctg | tcactcctgc | cacaccccgg | tcagacactg | tcaggccaca | 14940 |
| | attccggctc | catccaccca | cccacccgag | ccaacgccaa | agcaggctat | ttgccaaagc | 15000 |
| | ccacccctta | cccacaggcc | cgcctcttgc | tctccaagc | tacgcccctc | ccctaaccaa | 15060 |
| 15 | gcccacgtgc | ctccctccaa | agctcttccc | tctttcacgc | tcatgcttct | tcgtctatca | 15120 |
| | atccatttaa | ttgctatata | tataaaaaaca | taaatttata | tatatactta | gagacagggt | 15180 |
| | ctcacaaatgt | tgggcagggt | gaactcctga | cctcaagcaa | tctccctatc | tcagcctccc | 15240 |
| | aaagtgtctag | gactacaggc | gtgagccacc | gcgctcgaca | tcaaccacta | catattgaat | 15300 |
| | gtccagtgtc | tgtgaaaacc | tgtggctcct | ctccacatat | aaacaacctc | tcctaagctc | 15360 |
| 20 | cactccctcc | ccatcccttg | tcagcaactg | gcccagggtg | cctttcagct | ccttgcggtc | 15420 |
| | ccggtaccag | cgcagggtgg | cagccggagc | ggaccgcgga | acgaggcagc | tgagctccac | 15480 |
| | ctcgcgcgcc | tctaccgcct | gtccccggac | ctccaccaca | ggattctctg | gggccactgc | 15540 |
| | cgcaggggaga | aggaagtaa | ggggttaaag | aaggcacgaa | cgtgggctca | aagcgatcga | 15600 |
| | gctgcctgtt | cccagcgacc | atagggaacc | agggtcccg | gtggcagggg | tcaaagggga | 15660 |
| 25 | gaggctcagga | gccagatgcc | catccaggat | gttaaaaaata | gccatggctc | gaaagtctca | 15720 |
| | ggagaagaga | gaagcagaga | agaaaggagg | agaggatgct | tctgacaagg | gggaggggct | 15780 |
| | tacctagtac | gtgagcgtg | gcaatctggt | ggtgggtgtc | ttctgtgtag | agctggcaga | 15840 |
| | aatagccccc | ctcgtccctc | aggcgggcat | ctgagagccg | gatccgcacc | cggcgtgggg | 15900 |
| | agaactcctc | aagctggaaa | cgctcatcct | tcaaggctag | agagagttag | ggggaagggt | 15960 |
| 30 | tgaatttcgg | gagtcctggc | ctcacaagtc | ccacccttcc | gacaggagct | tagagtccag | 16020 |
| | cctcttgcct | ctttttctcca | gccatatcta | tgagtcttag | gtgtccaact | atttactccc | 16080 |
| | ttgaggaccc | agcattatct | aagtcctctc | gcctgcagga | ccagcagctc | gggaccccag | 16140 |
| | ccctttcttc | tccgagaccc | aggagaccaa | actctcaggt | gtgtcctctt | tcaggacatg | 16200 |
| | ggagcctggg | ccccagccct | ctcttctctt | aagactcctg | agtctgggtc | ccagcactca | 16260 |
| 35 | ccacgggtgc | cattgaagaa | gagggtctgc | cgggctgggt | tctggatgac | aactatggac | 16320 |
| | ccatcatact | ggtgcagacg | gcagggtgatc | tcagccaccc | cacctcagc | cactgtcacg | 16380 |
| | ttctctgtct | gtacttccctg | tcttgcctct | ggacgattag | acaaagagac | aggatagaag | 16440 |
| | acttacttag | agctgcaatt | caattttttc | tttctccctc | ttccccatcc | aaacctccaa | 16500 |
| | tcctctctct | tccctcatt | catccatttg | cactgaacat | ttcttgcagg | ctagagtcca | 16560 |
| 40 | ggacagggag | gaaatctgct | ccctactcta | aacagagctgc | agtcaagatt | tagtagaata | 16620 |
| | tgtctaatg | agggcagcac | agggcacact | aggagcccag | agcaagggag | gactattata | 16680 |
| | gaattgccta | gagagatggg | tagccagaga | gggctctgca | agaaagctcc | attggatctg | 16740 |
| | gatctttaaag | agtaagcagg | aggctgagcg | cgggtggctca | tgctgtaat | cccagcactt | 16800 |
| | tgagaggccg | aggtggggcg | atcgcaaggt | caagagatag | agaccatcct | ggccaacatg | 16860 |
| 45 | gtgaaacctt | gtcactacta | aaaatacaaa | aaaaaaaaaa | aaattagctg | gggtgtgggtg | 16920 |
| | tgcgcacctg | tagtcccagc | tactcgggag | gctgaggcag | gggaatcgct | tgaacctggg | 16980 |
| | agttggaagt | tgcagtggag | cgagatggag | ccactgcact | ccaggctggg | cgacagagcg | 17040 |
| | agactctgtc | tcaaaaaaaaa | aaagaaagaa | aaaaaagagt | aagcaggagt | tcacaagggtg | 17100 |
| | tgggagactg | ctgtgtgttc | accaagcctc | atctttcaca | cctgggcaca | tgtttagacc | 17160 |
| 50 | cgtttgcaaa | gatagccgta | atattctcct | gtccctggac | atgccctttg | caagttgatt | 17220 |
| | ttgccatttc | tcccatgtag | aaggcacttt | gtcccttact | agtctgggta | agccttgaga | 17280 |
| | gttgcttttg | ccaatagaat | ttgctagaag | tgatatttag | cctaggcctg | aagaggcctt | 17340 |
| | gtagcttcca | ctcctgcctt | aagactgttg | catgaagata | cccagactag | tgtctttgca | 17400 |
| | gatgaacaat | catggtgaaa | gagaagccca | gccggcagcc | agcaccaatc | gccagctgtg | 17460 |
| 55 | tgagtgtggc | catcctggat | catccagccc | cagctgcccc | accagctgac | agcagccaca | 17520 |
| | caagtgaccc | cagttgagac | caataaaaaga | tctgcccctc | tgatacagcc | caaactgtctg | 17580 |
| | aacccccagaa | tcatgaacaa | ataaggtggt | ggttggtttta | agctcctaag | ttgtgggtga | 17640 |
| | tctgttctac | tgctaaagtt | aactgatata | atacataatt | aggctatact | tcccagcatc | 17700 |

| | | | | | | | |
|----|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------|
| | ctttatagtt | aggtggggcc | atgtgaccaa | ttctggccaa | tgggatgtag | gtggaagaga | 17760 |
| | aacacctctt | gcagcctgac | ccatctccct | cataatccct | cacactggct | gaacagagag | 17820 |
| | gactccaagg | agcctagagg | agggcagaat | cacaagccag | aaggaacctg | ggctcttaac | 17880 |
| | tgactgtccc | ccatgaccgg | cctgtatagg | actgtgatat | gagcaagaaa | tataaccttt | 17940 |
| 5 | tgtaagcca | ttgagatttc | aggggtgtct | gttacagcct | ttaacctacc | ctgattaatc | 18000 |
| | catcagaaaa | acaaggtggg | gaatctagaa | ccatcagaga | aaagcattta | ggaaagctga | 18060 |
| | aagccaagac | taatcatcag | cattaatatc | atcatctgtt | gtcttcaaaa | taacaataac | 18120 |
| | ccccatagct | accaattatt | aggtacttgc | agtgttagtc | cctgtgctaa | gggcattacc | 18180 |
| | catataactt | acctttaatc | ctcacaatcc | ctgtgtaagg | tagacatgat | tattatcatt | 18240 |
| 10 | attattatta | ttttgggaca | gagtattgct | ctgttgccca | ggctggagtg | cagtgggtgtg | 18300 |
| | atctcagctc | attgaaacct | ccacctccca | agttcaagcg | attcttcagc | ctcagcctcc | 18360 |
| | caagtagctg | gaattacagg | catgcaccac | catgccgggc | taatttttat | ttttagtaga | 18420 |
| | gacagagttt | agccatattg | gcctggctgg | tctcgaactc | ctggcctcaa | gtgatccgcc | 18480 |
| | tgccctcagcc | tcccaaagtc | cagggattac | aggtgcgacc | caccgcgctt | ggccaattat | 18540 |
| 15 | tattattatt | tttaatttga | gacaaggtag | ggctggagtg | cagtggcacg | atctcagctc | 18600 |
| | actgcaatgt | ctgcctccca | ggctcgagtg | atcccacctc | agcctcccca | gtagctgaa | 18660 |
| | ctacaggtgc | acaacatcac | acctggctaa | cttttgtatt | tttttagaga | cggagtttca | 18720 |
| | ccgtgttgcc | caggctggtc | ttgaacttgc | gagctcaagt | gaactgcctg | cttcggcctc | 18780 |
| | ccaaagtgtc | gggattacag | gcattgagcca | ctgtgcccgg | cctgcgctat | tattatcccc | 18840 |
| 20 | attttgcccg | gcctgcgcta | ctattatccc | cattttcccc | catttccatt | tttcttttct | 18900 |
| | tttttttttt | tttttttttt | tgagacattg | tcttgctctg | tcgccaggcg | tagagtgcag | 18960 |
| | tggtacgata | tcggctcact | gcaacctcca | cttcccgggt | tcaagcaatt | ctcctgcctc | 19020 |
| | agcctcccaa | gtagctggga | ttataggcac | ctgccactgc | acttggtctaa | tctttgtgtt | 19080 |
| | tttagtaaaag | acgggggtctc | accatcttgg | ccaggtctgt | ctggaactcc | tgacctcgctg | 19140 |
| 25 | atccaccgcg | ctcggcctcc | caaagtgtcg | ggattacagg | cttgagctat | cgtgtcctgc | 19200 |
| | tcccattccc | attttatagg | tgagaaaatt | ggcccacaga | gatgaaatga | cttgcccaag | 19260 |
| | ttcacagcca | agagtggcag | tgccaaaatc | ttcgtccaaa | tctctgatcc | tgtatcctga | 19320 |
| | atctgtatat | ccactcctgg | ctgtctggat | taagtgtcca | tcattggcag | ggggtgtgtga | 19380 |
| | gagccgcttg | tgatgggcct | cgaatgccaa | cctaggagat | ttgctttcat | cctaaggggcc | 19440 |
| 30 | agtgaagggt | ttgaagcagg | aatatgccat | gattagatct | ggctatttgt | ctttaagtgc | 19500 |
| | tggtataacta | tccatgtctt | ttacattcag | gtgctgggtt | gcattcattc | aggagtattt | 19560 |
| | cctgagcatc | acgtaggttt | tcaggggctg | agtagtcaga | gatgagttag | atgaggtccc | 19620 |
| | tgccctttta | gatttatggg | aaggtaggaa | ccaatcacgg | taatcaaaag | tgttatgtgg | 19680 |
| | ctgggcacgg | tggtccacac | ctgtaatccc | agcacttttg | gaggccgagg | tgggcggtac | 19740 |
| 35 | acaaggtcag | gagttcgaga | ccagcctgag | caactgggtg | aaaccccgct | tgactaaaaa | 19800 |
| | atacaaaaaat | tagccaggtg | tggtggtggg | gccttgtaat | tccagctact | caggaggctg | 19860 |
| | aggcataaga | atcgcttgaa | cctgggaggc | agaggttgca | gtgagccaag | atcgcgccac | 19920 |
| | tgaggtccag | cctgggtgac | agagcaagac | tccgtttcaa | aaaagaaaaa | aaaaaaagaa | 19980 |
| | ataaataaaaa | gaaagtgtta | tgttttctgt | aagagggtag | gtaacctaat | ttggaagttg | 20040 |
| 40 | aggggtagaa | aagattattt | ctgggggatg | gagacagaga | cttctggctt | cctattctga | 20100 |
| | catccatttt | tccctttctc | ctcagtaaaa | gaaaagaaca | ctggttgat | tttatggttg | 20160 |
| | cactatgtcc | agcagaaaaa | ggcattcctc | agtctccttg | cagcaaggta | aagccattcg | 20220 |
| | ataaaatttt | gtccagttgg | atataagcca | aatgtttgcg | tgacaatttt | gggaggactt | 20280 |
| | cctgaaacag | gtggacaaac | cctttttcta | ctgagtcacc | tttgtgccac | ctggaactaa | 20340 |
| 45 | cagtgtgacg | cgtggaattt | aggcagccat | attgaacct | gaggacaaga | gcagtgggga | 20400 |
| | tggcggaacc | aagagctgga | aggtgcctga | gtctctggtg | aagatgtgga | gctgctgtaa | 20460 |
| | cagccctcaa | ctcctagtcc | tggacttctt | ttatgtttta | gtgtaacgct | ttgggtattt | 20520 |
| | ttattttttt | aatttatttt | agagatgagg | tctcactatg | ttgcctaggc | tggactcaaa | 20580 |
| | ctcttatgct | caagcagctc | tccctgcctca | gcttcatgag | tagctgaaac | tatagcactt | 20640 |
| 50 | tgggtatttc | agccactgtt | tgaggttttt | ctagcacctc | ctggaatata | aagcttaaca | 20700 |
| | tgtccaatcc | ttgccccaga | tattttctct | cccaaatttt | ctcaatctca | ataaatgtca | 20760 |
| | ccaccatcca | cctgggtgct | caggtcaaaa | acctagaaat | cattcaagtt | ctctcccttt | 20820 |
| | ccctcatccc | caatatccat | tccatcagca | acatctgtcc | attctacctc | caagacatat | 20880 |
| | cccagatctc | atcacctttg | tctgcctctc | ctaccctcac | tctcatccag | catcatccct | 20940 |
| 55 | cacctggact | ctgcaaaagc | ctactcgtgg | gtctgtctgc | atccctgtct | gcctctccca | 21000 |
| | gggcccattct | ccacccagtg | gccggatcga | tttttcaaaag | aggtaaatca | gatcaattca | 21060 |
| | cctttctgct | taaaaccctc | cgagggctgc | ccgtaacatg | tagaataaaa | tagagacccc | 21120 |
| | ttcccgggga | cttcaagggtg | ctatatggcc | tggccccttg | ctgaccttac | ttcactctgg | 21180 |

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55

gctcgctagg cttgctgtcc ctcaaacatg ctgagctcgc tcccaccaca ggcccttttc 21240
cctttttctt cttctgcttg gaatgttctt ctccccacct cccaagcccc atcttcccag 21300
ggctgaactcc tgttcccatc tgggtctcaa atcatatcag tacctttctca gagaggcctt 21360
ccctcaactgc tcatcccttc accttttagaa cactttcttt tcttttaaga gacaaagtca 21420
gcccagtgcg gtggctcacg cctgtaatac cagcaactttt gagaggccaa ggccgggcaga 21480
tcacctcagg tcaggagttc aagaccagcc tggccaacgt ggccgaaacc cgtctctact 21540
aaaaaaatac aaaaattagc taggcagtggt tagcccgggc tactcaggag gctgaggcag 21600
aattgcttga acccaggagg cagaggttgc agtgagccga gattgagcca ctgcacccca 21660
acctgggtga cagagagaga ctctgtctca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa agacagggtta 21720
ttgtctctgc acccaggctg gagtgcagtg gtgcaatcat ggctcaactgc agcctcgaac 21780
tcctgggctc aagccatcct cccacctcag cctcctaagt agctgagatt ataggctcct 21840
cccaccacac ctggctaatt tttgtgcttt ttgtggagac acagattctc catgttgccc 21900
aggctggctc ccaactcctg gggtcaaaagg atcctcctgc ctggccttcc caaagtgtcg 21960
ggattacagg cgtgagccac tgcgcctggc ccagaacact tgctatttcc tcaccattgc 22020
tttatttctt ctatgaagat ttcaactggaa ttatcagatt aatttgettta tttgtttact 22080
gtctgtttgt caccatgac tggatgtat actctaggaa ggcagggata taatccaatg 22140
ggtttactgc tgcaccccta gtacccagaa gagtgccttg cacctgataa gtgtctgggg 22200
aacttgetac atgaattaca tgtgtcagat gggatatctg ttctcttttc ttctctcttt 22260
ttctttcttc tctttctctc tctctttctt tctctttctt tctttttctt ttttttgaga 22320
taaggctctc ctctgtcacc caggctagag tgcagtggtg caatcatggc tcactgcgac 22380
cttgaacatg tgggtctcaag cgatcctccc acctcaggct accaaatagc taagactaca 22440
gaggtgcgta gctatgccc a gctaattaaa aaaaaaaaaa tttttttttt ttttttagaga 22500
tgggggtctc aatatcttgc ccagggttgg cttgaactcc taggctcaag caatccccct 22560
gccttggcct cccaaagtgc tgggattata ggcagtgacc attgcagctg gccagacag 22620
aatctcattt cagccccaga actttgtgac atcattattt tcactctaaa cacctaggtt 22680
gatccccagt caaccacttg ccatctgtgt gacctgtggg caagtgcact tacctttcgg 22740
agcctcagtt gccccatcta taaaatggga atgatgccag tgcttgctc ataaggatga 22800
gccccgctcc tgaagctcag ggagccctct ctgcaaggct gtttttagtg aacctccgga 22860
aacatgccc a tgcattgtga aactggcatg cacattctgg tgcttttaaa aacatctcga 22920
agcctatcca cagatcctgg acctcaagac tgggtcagtg ctagccccc attttacaga 22980
tgtggagaat gaggcttagc ggggtcccagg caagtgcagtg gcaaaactca ccactcctg 23040
ggagccatca ggttctctg gatctgcccc caccaaattt atcccctgct ctctgctga 23100
gggtgcacat ggggtgaggg tgggttctt tctgtttact cctccccct cctgaggagt 23160
cagtaaccaa cagtgctctg gcctggaata ttaatgtctc agcagctttt gtttgggggg 23220
ttgggggttg tgggggctgg actttctggg cagagagggg ctgagctttg gggactgagg 23280
cactggccct ttaaactgtg ttgacagcca ggagtcgtca tggggatggt gcttggaaaa 23340
ggggacaggg aggggtttgg aaagagtggc ggagcaggtta atgcgtaaga cccagggaatc 23400
cagcccccaa ctacctctc tcccaggacc caggagtcta ggctcccagc cctcctcca 23460
tcagggtcca ggagctgga acccggtt ctttcgcct tagaccaggg aattcagccc 23520
ccaaccacct cctctctcag gttcccgaaa tccagacccc tagccccct ctcgatcagg 23580
accaggagt ctgggtgtc agcagccct tcttcaaac ctaggagtca gagccccag 23640
cctctccta gcttagacac aggagtctgg gcctccagcc cctcctcct tcaggaccca 23700
ggagccaggg gtccagagta cacagctggt ggatgtttcc acggagacta agcagggtgg 23760
ggggagcgct tcctgggtcc tgagtgcagc aatacccaag ggagtctcaa ggtcatagtt 23820
ccgggaaggt caccaccacc cctctgtat ccgctccca gggggtcct ggcacctgc 23880
ctccttcccc cttcctccct tagggagtg gtacatccct gcgtcctgac tgaaccccc 23940
tcagccccc atcaatggcg gagtccgaac atcctgcac aaagcgtcaa tcttccccca 24000
gctcagcct gtgaaggcgc ctgtattcgc aggacctagg cgtcagggtc tcagccctc 24060
ctcctcaga aacctgcagt ggaatcccc gcctccagcc ccttctctcc tcaggaccca 24120
ggagtctgta tctcctccc tctcctccc aagacctagg agtgtggact cccagcccc 24180
ttttcttcc ggacacagga gttccagccc tgggctct cctctcttaa acccagggtt 24240
ctaagacccc agcctcctc tctccaaa ctaggagtct aagatcccag gccctctc 24300
cctcagactc aggagtctaa gatcccagc cctcctccc tcagactcag gagtctaaga 24360
ccccaggccc cctcctccc agactcagga gtctaagat ccaggccct cctcctcag 24420
accaggagt ctaagacccc agccctcct cctcagact caggagtcta agacccagc 24480
cctcctccc tcagactcag gagtctaaga cccagcccc ctcctcctg gaccaggag 24540
cctaagacct cagcccccct cctcttgaga cccaggagt taagacctta gctcctcct 24600
ccttttagacc cattagtcca gggccccaga cctcctcca tcagaccag gagtccaggc 24660

cccagagcccc tctccatca gatccagccc ctcctctctt gaaaactttt gactctaact 24720
 cccagagcccc caacccctag aagcacagtc ctgcctttcc tcaatcctct gtcccccctc 24780
 atctggggac ctaggcatca ggtggggcg taggggtgag tcagcaacct cacacacaaa 24840
 gtccccgctg tggccccac attcctggga tattcgggac tccctggatt ccaggcctca 24900
 5 gggccagcca gggagtgggg agtccccag aggtcctccc tgggtgtggg gtacgagagg 24960
 aattcctgct cggggaaggg tgcaggcctg cactgagctc cctctgtccg aacctccacg 25020
 cccagtgcctc tctattcacc cctctctccc agaagagccc aggtctcagca cctgccccct 25080
 gccccactgg gtgcccacgg aggagcctgc gtgcctgctc cctatgggccc tggggtctgc 25140
 acaggcgga atcagtgggt gcttccgttc tgatgccaca ggccattgga tgctggcggg 25200
 10 tctgactgtc tccaggccac cccccacccc tcccagagag agaaagctgc ctttgtgttc 25260
 tccaagatgg ggacaggcca ggtcgcacg acattaaccc agccttaggc cccagccctg 25320
 ctgtgtctaa ggtcttgga tccactgcag aacctgaccc ccacccccag gctctgggga 25380
 cacaggcgcc tggctcatgg gtgggtgggt ggggggggtca gtgatagaaa cctccaaaac 25440
 ctgttctctg ggtgactca caatggaggg aggggtcccc tattctcaag agtggctggg 25500
 15 cagaatttta caggaaaaa gtgagtcacc ctgggaagga aacattattt agggaccaac 25560
 aactgcccc tccacaagac cctcaactc ctaatagcct ctctattctt tctttgtatt 25620
 ggatatctgt tctctctct cctttctgtt ctaccagtt tctggctgcg ggtcccattt 25680
 ctgctgggtg gcctccttg gcaggcaacc catccctccc tcttgctttc tctcctctgc 25740
 ccacctggga tcttctttg ggcataaate tcatctctt ctgctatgct cagaagatga 25800
 20 atgaaccagg agagagagaa catgttttta aaatggcgca aatgcacccc atctcccccg 25860
 attcctgctg gctgggcaag gtgagagagg aagaagtgc taagagagaa atgtgggaac 25920
 aacagatacc cctaaaaatg ggtagccaa ggccactgag aaatatccaa tggaaaggag 25980
 agcaggaagg gccctccaag accatcatgt acagcctcct accccatgct ttacagaacg 26040
 ggaaagtaag gccagagag ggacaaggac tgatgcaaaa ttatactaaa gggctctggg 26100
 25 taaggcttgg acccaagttc cttagctccc agctgagagc tcttcccatg acaccaagct 26160
 cagtttctac tggtaaaagc cacatactat ttactttaga gaaagtttac agagaggggt 26220
 aggggtgccg gaagcagtga cttggaaatc aaacgagggg cagggctgta gacctaaact 26280
 ccagaagcac cagagaaagg cttttgcacg gggcggtggg tcaccttaag ctatattctg 26340
 atcctgagaa ttcaaaagtct gatgattcta agctgtcagg attctaaatg tcatagatgt 26400
 30 caagatccag gaactccaag acatcaagat ttcacgattt ttaagacgtc aagatgctag 26460
 catgctaaca ccatcacggt tctagaactt taaaggtgtc aagattctaa agccttctgg 26520
 attctagaat cctgtagatg tcagcattct aaagtaccat cagggtcttt atttactgga 26580
 ttcattagtt ccaggattct atgagcctgg tgtttagcct aaaaaataaa gataaattaa 26640
 aattgatgga aatgtcactg aggtaccaaa gttctcatct gggaaattgt ggcattgtctg 26700
 35 ttgtaaagaa aggaggtaat gatgcaagt ctaaagcagt cacagaagac tagagaagaa 26760
 agaaagacag tgagaggaca gctttgcccc tcatcctggc cgaggtgagg atggctctgc 26820
 ctcaaaccct ggagtgggga acatgtaacc gcactcaact tgccagaaac ccttctacgg 26880
 tctgagctgg cgttcccttt catgtcactg agttcaacat cctcacttta cagaaagaga 26940
 aacagaagcc tggagagagg aaggtgttta ccattggctg cgatggcaaa tggcaagagc 27000
 40 caagatttaa gccagggccg ccagccccat gccacctggt tataactcct ctcaccaatc 27060
 tctgcccgaac acccagccct cctgcttctg cctagccacc ttccaatcct ctgttctctc 27120
 caaaagtggc cttatccacc agggaggggt gaccctggg aggttcaaga cttacacagt 27180
 gtgagagtgt gtgtgggtga catttctctga ccttgctccc attctcaggg tcaccaacc 27240
 45 tgggggtctt ccagcttctc acagtgtgtg atgagggat gtggatggct ccctggatgt 27300
 cctggacagg ggcttctctg tgagtcaagc ctgggtgtgt gaatgggtga gcagggtttg 27360
 gagaggcatt cgctgaatcc acgtgtgtgc ctacacgcca aggtccccca ttctcacttc 27420
 cccacacaca tgcacacaga tgttccccct cagggctctt tagaatgccc tgctgactg 27480
 aattcctctt caggggcaca gagggataga gagaggagg aaggtaggat gggaaatggg 27540
 gatccccgga tggaggtgtt aagcgtagag agaggaggca cagcagaaag acaggatgg 27600
 50 agatagtggg acagagaagg gggaaagaga caggtgacag aaagggttag agaaacgagt 27660
 gacagaaaga caggggacag agacaagggg atggggcaga taggggacag agaaaaaggg 27720
 acagaaaaac aagggtgaca gcgagacaga gacagggacc aagaataggg gcagagaggg 27780
 agggcagaaa tccgggggaa agagaataga caggatgatg gaggggacag agtgaccacg 27840
 gaaaagggga cagagaccag gggacagagg taggggacaa agacagaata gatgaggaac 27900
 55 accgaggcaa gaagagaggg agacagacag aaggagggac aggacttctga gactgagga 27960
 tagaggacaa gggtaggggg acgaggagcc agacgggggg gttcagagac gggcgagacg 28020
 agggacgcag agactggaca gaaggacagc gggaccggcc tggggagggg ggacttgtgt 28080
 gtgtaggggg gtctcgggccc ctttgtcccc gccgggatcc agcctgcgcg ggtggggggg 28140

| | | | | | | | |
|----|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------|
| | ctgggggacg | ggggggggg | ccggggcccc | ctcccccgct | cgteggctccc | gggtccccggc | 28200 |
| | ccggggctgg | ctttgtcccc | gggagggggg | ccggggccggc | ccggggcgcca | ttgtttcgcc | 28260 |
| | tctggggccc | cgaggctgcc | gggctgtcac | cacagcgccg | cccccgcccc | agcccgcccg | 28320 |
| | gcccagcccc | gcccccgacc | ctacctggcc | ccggcgccggc | cgcccacagc | agcagcagcg | 28380 |
| 5 | gccaactggaa | ggcgccgggg | cgggcccatgg | tgccgcgcgc | ggcgccgcgc | ccgctcgctc | 28440 |
| | ccggccccggg | acctgcaccg | ccggcgccggc | ccggccccgccc | cccccgccgc | cgccccctgc | 28500 |
| | ccggccccggg | ggggggcgcc | gaggccgggg | cgggggccggg | gaggggaggg | ggagacggag | 28560 |
| | gagagggccc | gagacaatcg | gggggacggc | acgggtgggg | aacgggtgcg | gggtgcgaaag | 28620 |
| | ctggagagga | gaggggtgag | gagggcgggg | aggggtgcgc | gggagggcga | cagcggcgtg | 28680 |
| 10 | ggagcaggtg | ggggatctcg | gtgagcgccg | gaaatggagg | gtgttggtg | aggggtgctg | 28740 |
| | gtgccccccc | aggtgctgcg | cgcgaggggtg | cggagttgct | ggcatgcagg | gtgcttgcgc | 28800 |
| | tgcgccggagg | ggaggggtgg | aggggtgttg | tggaggctgt | gcgaggggtg | gggcccgggg | 28860 |
| | gtcggtgggg | gcggtgtgtg | cgaagggaga | gcgtggccag | cgtagcgggg | gagcgtaaag | 28920 |
| | gagggagtg | gacgtgggaa | aggtgagtg | gagagggctg | ctgccccgag | gtgggtgtct | 28980 |
| 15 | ggagtctagc | gagagggctg | gagctgagcc | accgggacag | gggagggctg | agctggagg | 29040 |
| | ccggaggggtc | cggaggtcga | ggcaggtcaa | ggatctccca | gggcagggcg | aggtcggggc | 29100 |
| | tcaggagtg | ggtgggggtc | gttccctccc | tccctctctc | ctgtccctgac | ctgaaaaacc | 29160 |
| | cgtgtttccg | cgtcattctc | cgggaggggg | ccccgaaag | tgaactaact | ggaagggaagc | 29220 |
| | ctgaattcct | ggtcccaagg | gggagaggct | ctgtgaaac | ccttccaagc | cctggcgctc | 29280 |
| 20 | cctctcctcc | ctgctgtctc | cctgccccag | cctctctccc | tctctctgca | tgtatttgcc | 29340 |
| | tctgcccttc | ctctctcccc | atctttgagg | gtgactcacc | cctccagact | taggtccctt | 29400 |
| | ctccctcctg | ggagtgggtt | tccctgagcc | cacttctgtg | acaccctgta | gacctgatgc | 29460 |
| | gggatcatta | cctatgggac | ccagaaaagag | tgagaaaacca | tggaaaagaag | gcctcgacct | 29520 |
| | ctctcatgcc | catttgtcag | gcaaaactgag | gtccagaagt | gccaattatg | aacatctttc | 29580 |
| 25 | cttccccctg | ccccctccc | cgcccagacg | gagctctcgt | ctgttgccca | ggctggagtg | 29640 |
| | cagtggcacg | atctcgactc | actgcaacct | ctgctcccca | gggtccagtg | attctcctgc | 29700 |
| | ctcagcctcc | cgagtagctg | agattacagg | cgcccgccac | catgcctagc | taatttttat | 29760 |
| | attttttagta | gagacggagt | tttgccatgc | tggccaggct | ggtcttgaac | tccttacctc | 29820 |
| | aggtgatcca | tctgtctggc | ctcccaaagt | gctggattac | aggcgtgagc | caccatgcct | 29880 |
| 30 | ggctgaaaaat | ccttactttt | tattccgact | aaaaaatttt | acatccagtc | ccacaaggga | 29940 |
| | cttcagcttc | acacaccctt | tctgtctca | gtaccagct | cccagtatcc | tttctgacct | 30000 |
| | caaaaccata | gctaccatca | acccttgtgt | cccaggacca | tggctcccag | tgtctctctc | 30060 |
| | gtcctcaggg | tccaagctcc | catcaactcc | tgtgtctca | ggaccacggc | tcccagcatc | 30120 |
| | ctctctgtcc | ttcagggtcca | agctcccatc | aaccctgtg | aagcaggacc | atggctccca | 30180 |
| 35 | gcatectctc | tgtcctcagg | gtccaagctc | ctatcaactc | ctgtgtcccc | aggacgatgg | 30240 |
| | ctccagcaat | cctctctgtc | ctgagagccc | aagcttctaa | ctgcccctgt | gtccccagat | 30300 |
| | ccatagccct | gagcaacttc | cttctttttc | agtcctcagc | ttcccagctt | ctgtagactt | 30360 |
| | gggaagagat | agtctctaat | cctctttcca | gggtctacat | tctgtgactt | ttgctagatg | 30420 |
| | ggagaggaat | gtttgatctg | cctttggaat | actggtccaa | ggggtaacta | gtagttgcct | 30480 |
| 40 | tttcccgag | gagccaatag | gcccgcctac | tctgtgctct | gacagatgtc | tctgtctcca | 30540 |
| | gctgaagggg | aaccttggga | gatgttggtt | tgggttctac | ctgtcatcct | taagtccac | 30600 |
| | cattccatgt | gaagacatca | caagagtagt | ggtcctgacg | ggcgcgttgg | ctcacacctg | 30660 |
| | taatcccagc | actttgggag | gccaagggtg | gcccagcact | tgagggtcagg | agtttgagac | 30720 |
| | cagcctgacc | aaccggccaa | catggtgaaa | caccatcttt | acaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | 30780 |
| 45 | ttagcaaggc | gtggtggcac | gtgcctgtaa | tcccagctgg | tcggaaggct | gaggcatgag | 30840 |
| | aatccccga | acttgggagg | cagagggtgc | agtgagctaa | gatcatgcca | ctgcactcca | 30900 |
| | gcctgggtga | cagaatgaga | ctcagtctaa | ataataataa | taataataat | aataataata | 30960 |
| | ataataataa | taaatagaat | agtgttctct | tccccatcct | acttcagggt | accctgtcca | 31020 |
| | ttagggattt | agtgcaagtg | acagcaagtg | caaccctaact | ggtttgagag | aaagagaact | 31080 |
| 50 | ggttcacaca | taacaaaaag | tccctctatg | gctggctttg | gcgaggtctg | tcaatctctg | 31140 |
| | tcctaaggat | gcattggctcc | cctcctgtag | caagatgggt | ggcagatacc | cctggggcca | 31200 |
| | gattcatatt | tgggtgtgatt | aagattctgc | aagagagaga | caacctttat | ttcacacagc | 31260 |
| | ttttcaattg | ttgcctgtcc | ctggtgagac | tcggagacct | agctcttgcc | tggtttctaa | 31320 |
| | actttcaata | acaccgtttt | tgcttaagtc | agcacaacaa | gatttttatt | cttgcaagca | 31380 |
| 55 | aagattcctg | aacaacaact | tcagagccgt | taacaatgag | gtcctgatca | caagctatgg | 31440 |
| | tataggacgt | gagaaatttg | tccctagcct | caatatctgc | tggagggcat | catggaataa | 31500 |
| | gtatttctat | cctctgatcc | ccactgtagg | gcacatggg | atatataatc | ctaaccctta | 31560 |
| | atctctgcc | tagagtttca | taggcaatgc | agtcctagcc | tcaatatgtt | gtaggggaatt | 31620 |

| | | | | | | | |
|----|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------|
| | atgggaaagg | tgaaattatc | ctcaattata | atcacagagca | tctcagaaaa | tgtcgtttta | 31680 |
| | gcctcatctc | tgtgttaggg | catcatggga | gatatacttc | tggcccaatt | tttgtgttaa | 31740 |
| | gttgccatag | aagatgcagt | ctttctctcc | tctccctttt | tcttttcttt | ctttctttct | 31800 |
| | tttttttttt | ttttattatg | tagagacagg | gtctctcgct | atgttgccca | ggctggctct | 31860 |
| 5 | gaactcctgg | gctcaagcag | ttctcctgcc | ttggcctccc | aaagtgcctg | gattacaggc | 31920 |
| | aagagccatt | gcacccagtc | ccttctctcc | tttctttctt | catcacctgc | catattccag | 31980 |
| | gcactaggaa | taaatcatca | agtaaaataa | cggccttacc | ctccctggca | attataatgg | 32040 |
| | ggaaagttag | ctaaaaacaa | acaaaaatta | ctgttccatt | taaccatcgc | tgaataacaa | 32100 |
| | aataccccag | aacgtagtgg | tgtgaaacaa | caacctttta | attttatgat | tctgtgagtc | 32160 |
| 10 | aggaattgga | gcaggattgg | tgtgtatctg | cttcatgatg | aactggagcc | aaaaatgaac | 32220 |
| | tagctggaac | agctggagat | ggaggggagg | ggcatcaagg | gccatatatc | taaggctggt | 32280 |
| | gggtgggtgt | gtgggttttg | aatagtgtcc | tccaagtaaa | atatatgttg | aagttctagc | 32340 |
| | ccctgggtatc | tgtacatgtg | accttatttg | gaaataaaat | ctttgcaaat | gtaattcact | 32400 |
| | tttttggttg | tttgtttgtt | tgtctgagac | tgagtctcgc | tctgtcaccc | aggctggagt | 32460 |
| 15 | gcagtggcat | gatctcggct | cactgtaac | ttcacctcct | gggttcaagg | gattctcctg | 32520 |
| | cctcagcctc | ccaagtagct | gggattatag | gcacgtgtca | ccatgccag | ctaatttttg | 32580 |
| | tattttcagt | agggacgggg | tttcaccatg | ttggccaggc | tggctctgaa | ctcctgacct | 32640 |
| | caaagtatct | gccacctcag | cctcccaaag | tgctgggatt | ataggcatgg | ggcactgcat | 32700 |
| | cctgccccaga | tgtgattaac | ttctaacccc | tggtatcttt | gcattgtgact | ttatttggaa | 32760 |
| 20 | ataagggtggg | tttttttctt | gttttttttt | ttttttttga | gacagtttca | ctttgtcgct | 32820 |
| | caggctggag | ttcagttgca | taatctcagc | tcactgaaac | ctctgcctcc | gaggctcaag | 32880 |
| | cgactctccc | gcctcagctc | cccaggtcac | tgggactacg | ggcaagcgcc | accacacccg | 32940 |
| | gctaattgtt | gcagtttttg | tagagatggg | gttttgccat | gttgcccagg | cggctctcaa | 33000 |
| | ttgccaccct | caagcaattc | atccgcctcg | gcctcccaga | gtgctggaat | tatagggtgtg | 33060 |
| 25 | agccatggcg | cccggccaga | aagtcttttg | agatttagtt | gaattaatga | ctaaatgttt | 33120 |
| | ccatgctgag | ttagagtggg | ctctaaatcc | aatgattgat | atgggggttat | aaggagagat | 33180 |
| | atttggagac | atagccacag | tcccagggaa | ggtggacatt | ggaagacaga | ggtagggatt | 33240 |
| | agagtgatgc | agctacaagc | caagggaatg | caaagattgc | tggcagtcct | tcagaagcaa | 33300 |
| | aggagaggca | aggaagggtt | cttcccttga | gacttttttt | tttttttttg | agacggagtc | 33360 |
| 30 | tcactgctgt | cagcctcagc | tggagtgcga | tggcgcgatc | tcggctcact | gcaacctctg | 33420 |
| | cctcccagggt | tccagcaatt | ctcctgcctc | agcctcccga | gtaactgaga | ttacaggcac | 33480 |
| | ccgccaccat | gcctggctag | tttttgcat | tttagtagag | atgggatttc | accctgttgg | 33540 |
| | ccaggctggt | ctcgaactcc | tgacctcagg | tgatccaccc | gcctcggcct | cccaaagtgc | 33600 |
| | tgggattaca | ggtgtcagcc | ccggagactt | taaaagcatg | gctcttcccc | tgacgcttta | 33660 |
| 35 | aaagcgtggc | tcttcccggt | agacttcaac | accttgggtt | tggacattta | gcatttcagaa | 33720 |
| | ctgtgagaga | acaagtttct | agtgtgtgtg | tgtgtgtgtg | tgtgtgtgtg | tgtgtgtgtg | 33780 |
| | tgtgtgtgtg | tgtgttttag | acagaggctc | attctgttgc | ccaggctgga | gtgcagtggg | 33840 |
| | tcaatctcgg | ctcactgcaa | actccgcttc | tcagattcaa | gtgattctta | tgccctcagcc | 33900 |
| | tcccaagtag | ctggaattac | agaggagcgc | catcacagcc | ggctattttt | tttttttttt | 33960 |
| 40 | tttgtacttt | tagtagagac | agggtttcac | tgtgttgccc | aggctggtct | caaattcctg | 34020 |
| | gcctcaagtg | atatgcctgc | cttggcctcc | caaagtgcctg | ggattacagg | tgtaagccac | 34080 |
| | cacacctggc | ctaagtttct | gtgtgtgtgt | gtgtgtgttt | tgttttgttt | tttttttttt | 34140 |
| | tttgagtggg | gtctcgctct | gttgcccagg | ctggagtgcg | gtggcatgat | ctcgactcac | 34200 |
| | tgcaagctcc | gcctcccggg | ttcacgccc | tctcctgcct | cagcctccc | agtagctggg | 34260 |
| 45 | actacaggca | cccaccacca | cgcccagtta | attttttgta | tttttaata | tgacagggtt | 34320 |
| | tcatcatggt | agccaggatg | gtctcgatct | cctgacctcg | tgatccgccc | gcctcagcct | 34380 |
| | cccgaattgc | tgggattaca | ggcatgagcc | accaaaaccg | gccaagtctc | tgtggtttta | 34440 |
| | agccaccttg | cttgtaagat | ttgtgtgtgt | gtgtttttta | ttttttattt | ttaagtatta | 34500 |
| | tgaatacata | atagtgggtg | atattttacag | gacatatgta | atatgggttt | gggttttagt | 34560 |
| 50 | gttttttttt | tggagacaga | gtctggctct | gttgcccagg | ctggagtaca | gtgggtggg | 34620 |
| | catggctcac | tgacgcttg | acctcccggg | ctcaagggat | cctcctgcct | cagcctccca | 34680 |
| | tgtaaactagg | accacaggca | tgccccacca | catccagcca | attttttttt | atttttagtg | 34740 |
| | gagatgaggt | ctcactgtgt | tgcccaggct | gatcttgaac | tcttgagctc | aagagatctt | 34800 |
| | cctttctcac | cctcccaaag | tgtaggact | acaggcatga | gccactgtgc | ctgtccttcc | 34860 |
| 55 | atgatgtttt | gatataggca | cacaatgtgt | tagtttataa | agtttgtaat | aatttatcac | 34920 |
| | aggcagccct | aggaaactaa | tatagccaag | tttctgtttt | cttctctata | tcacatctgc | 34980 |
| | tggggctaca | tgtccaaggt | ggcttcttca | cccactgtgc | tgggtgcctg | gctgagatgg | 35040 |
| | ctgaaacatc | tggggctcta | tctccacatg | gcattttata | atgagtagct | tgggcttctc | 35100 |

```

cacagcatgg  tgggtctcagg  gcagtagtar  ttttacaatgg  caaccagctt  cccacagagt  35160
agcgtttctaa  gattcagaaa  gtgaaaaatg  aaagtttctt  aaaacttggg  tccagaacat  35220
agcacagcaa  aacttccacc  acattctact  ggtaaaagca  gtcacagagt  cactcatatt  35280
caagaggcag  aagtacagac  ctcaactctt  taagccacta  cagtgcacag  tgggtgatatg  35340
tcattagaga  aagccctaaa  caagaacctt  gtccctcacc  tgcacccaaa  taccatggaa  35400
gatgtctttt  tttttttttt  tttttttttg  gggatagtct  cactgtgtca  tgcagtgggtg  35460
tgate  35465

```

```

10  <210> 57
    <211> 14327
    <212> ADN
    <213> Homo sapiens

```

```

15  <400> 57
    ggcgcggcgag  cgggcgggctg  cgggcgggcgc  ggagcggggcg  gcgcgggagcg  agcgagcgag  60
    agagcgggcgc  gggccggggcc  atgggggtggc  gggcgccggg  cgcgctgctg  ctggcgctgc  120
    tgctgcacgg  gcggctgctg  gcggtgaccc  atgggctgag  ggcatacgat  ggcttgtctc  180
    tgcctgagga  catagagacc  gtcacagcaa  gccaaatgcg  ctggacacat  tegtaccttt  240
    ctgatgatga  gtacatgctg  gctgacagca  tctcaggaga  cgacctgggc  agtggggacc  300
    tgggcagcgg  ggacttccag  atggtttatt  tccgagccct  ggtgaatttc  actcgtcca  360
    tcgagtacag  cctcagctg  gaggatgcag  gctccagaga  gtttcgagag  gtgtccgagg  420
    ctgtggtaga  cacgctggag  tcggagtact  tgaaaattcc  cggagaccag  gttgtcagtg  480
    tgggtgttcat  caaggagctg  gatggctggg  tttttgtgga  gctcgtatgt  ggctcggaa  540
    ggaatgcgga  tgggtgctcag  attcaggaga  tgctgctcag  ggtcatctcc  agcggctctg  600
    tggcctccta  cgtcacctct  ccccgaggat  tccagttccg  acgcctgggc  acagtcccc  660
    agttcccaag  agcctgcacg  gaggcgcagt  ttgcctgcca  cagctacaat  gagtgtgtgg  720
    ccttgagta  tcgctgtgac  cggcgggccc  actgcaggga  catgtctgat  gagctcaatt  780
    gtgaggagcc  agtccctggg  atcagcccca  cattctctct  ccttgtggag  acgacatctt  840
    taccgccccg  gccagagaca  accatcatgc  gacagccacc  agtcacccac  gctcctcagc  900
    ccttgcctcc  cgggttccgct  agggccctgc  cctgtgggccc  ccaggaggcc  gcatgccgca  960
    atgggcactg  catccccaga  gactacctct  gcgacggaca  ggaggactgc  gaggacggga  1020
    gcgatgagct  agactgtggc  cccccgccac  cctgtgagcc  caacgagttc  cctgtcggga  1080
    atggacattg  tgccctcaag  ctgtggcgct  gcgatggtga  ctttgactgt  gaggaccgaa  1140
    ctgatgaagc  caactgcccc  accaagcgtc  ctgaggaagt  gtgcggggccc  acacagtctc  1200
    gatgcgtctc  taccacacatg  tgcattccag  ccagcttcca  ctgtgacgag  gagagcgact  1260
    gtccctgaccg  gagcgacgag  tttggctgca  tgccccccca  ggtggtgaca  cctccccggg  1320
    agtccatcca  ggcttcccgg  ggccagacag  tgaccttcac  ctgcgtggcc  attggcgctc  1380
    ccaccccat  catcaattgg  aggtcaact  ggggccacat  cccctctcat  cccaggtgga  1440
    cagtgcacag  cgagggtggc  cgtggcacac  tgatcatccg  tgatgtgaag  gagtgcagac  1500
    aggggtgcct  cacctgtgag  gccatgaacg  cccggggcat  ggtgtttggc  attcctgacg  1560
    gtgtccttga  gctcgtccca  caacgaggcc  cctgccttga  cggccacttc  tacctggagc  1620
    acagcgccgc  ctgcctgccc  tgcttctgct  ttggcatcac  cagcgtgtgc  cagagcacc  1680
    gccgcttccg  ggaccagatc  aggtgcgct  ttgaccaacc  cgatgacttc  aagggtgtga  1740
    atgtgacaat  gcctgcgcag  cccggcacgc  caccctctc  ctccacgcag  ctgcagatcg  1800
    acccatccct  gcacgagttc  cagctagtag  acctgtcccg  ccgcttctc  gtccacgact  1860
    ccttctgggc  tctgctgaa  cagttcctgg  gcaacaagg  ggactcctat  ggcggctccc  1920
    tgcgttacia  cgtgcgtac  gagttggccc  gtggcatgct  ggagccagt  cagcgccgg  1980
    acgtggtcct  cgtgggtgcc  gggtaaccgc  tctctcccc  aggccacaca  cccacccaac  2040
    ctggtgctct  gaaccagcgc  caggtccagt  tctctgagga  gcaactgggtc  catgagtctg  2100
    gccggccggt  gcagcgcgcg  gagctgctgc  aggtgctgca  gagcctggag  gccgtgctca  2160
    tccagaccgt  gtacaacacc  aagatggcta  gcgtgggact  tagcgacatc  gccatggata  2220
    ccaccgtcac  ccattgccacc  agccatggcc  gtgcccacag  tgtggaggag  tgcagatgcc  2280
    ccattggcta  ttctggcttg  tctgcgaga  gctgtgatgc  ccacttcaact  cgggtgcttg  2340
    gtgggcccta  cctgggcacc  tgctctggtt  gcagttgcaa  tggccatgcc  agctcctgtg  2400
    acctgtgtga  tggccactgc  ctgaattgcc  agcacaacac  ggagggggcca  cagtgcacaa  2460
    agtgcaaggc  tggcttcttt  ggggacgcca  tgaaggccac  ggccacttcc  tgccggccct  2520
    gcccttgccc  atacatcgat  gcctcccgca  gattctcaga  cacttgcttc  ctggacacgg  2580

```

| | | | | | | | |
|----|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| | atggccaagc | cacatgtgac | gcctgtgccc | caggctacac | tggccgccc | tgtgagagct | 2640 |
| | gtgcccccg | atacagaggc | aaccccatcc | agcccgccg | gaagtgcagg | cccgtaacc | 2700 |
| | aggagattgt | gcgctgtgac | gagcgtggca | gcatggggac | ctccggggag | gcctgcccgt | 2760 |
| | gtaagaacaa | tgtggtgggg | cgcttgtgca | atgaatgtgc | tgacggctct | ttccacctga | 2820 |
| 5 | gtaccggaaa | ccccgatggc | tgctcaagt | gcttctgcat | gggtgtcagt | cgccactgca | 2880 |
| | ccagctcttc | atggagccgt | gcccagttgc | atggggcctc | tgaggagcct | ggtcacttca | 2940 |
| | gcctgaccaa | cgccgcaagc | acccacacca | ccaacgaggg | catcttctcc | cccacgcccc | 3000 |
| | gggaactggg | attctcctcc | ttccacagac | tcttatctgg | accctacttc | tggagcctcc | 3060 |
| | cttcacgctt | cctgggggac | aaggtagcct | cctatggagg | agagctgcgc | ttcacagtga | 3120 |
| 10 | cccagaggtc | ccagccgggc | ttccaccccc | tgcacgggca | gccgttgggtg | gtgctgcaag | 3180 |
| | gtaacaacat | catcctagag | caccatgtgg | cccaggagcc | cagccccggc | cagcccagca | 3240 |
| | ccttcattgt | gcctttccgg | gagcaagcat | ggcagcggcc | cgatgggcag | ccagccacac | 3300 |
| | gggagcacct | gctgatggca | ctggcaggca | tgcacacctc | cctgatccga | gcacacctacg | 3360 |
| | cccagcagcc | cgctgagagc | agggctctctg | gcacagcat | ggagctgggt | gtgcccaggg | 3420 |
| 15 | aaaccggcca | ggaccccgcg | ctggaagtgg | acagtgctc | ctgcccacc | gggtaccctg | 3480 |
| | ggcgtcctc | ccaggactgt | gacacaggct | acacacgcac | gcccagtgcc | ctctacctgg | 3540 |
| | gtacctgtga | acgctgcagc | tgccatggcc | actcagaggg | ctgcgagcca | gaaacagggtg | 3600 |
| | cctgccaggg | ctgccagcat | cacacggagg | gccctcgggtg | tgagcagtg | cagccaggat | 3660 |
| | actacgggga | cgcccagcgg | gggacaccac | aggactgcca | gctgtgcccc | tgctacggag | 3720 |
| 20 | accctgctgc | cggccagggt | gcccacactt | gttttctgga | cacagacggc | cacccacact | 3780 |
| | gtgatgcgtg | ctccccaggc | cacagtgggc | gtcactgtga | gaggtgcgcc | cctggctact | 3840 |
| | atggcaaccc | cagccagggc | cagccatgcc | aggagagacag | ccaggtgcca | gggcccatag | 3900 |
| | gctgcaactg | tgacccccaa | ggcagcgtca | gcagccagtg | tgatgctgct | ggctagtgcc | 3960 |
| | agtgaaggc | ccaggtagaa | ggcctcactt | gcagccactg | ccggccccac | cacttccacc | 4020 |
| 25 | tgagtccag | caaccagac | ggctgctgc | cctgcttctg | tatgggcatc | accagcagct | 4080 |
| | gcgccagctc | tgcctacaca | cgccacctga | tctccaccca | cttggcccc | ggggacttcc | 4140 |
| | aaggctttgc | cctggtgaac | ccacagcgaa | acagccgct | gacaggagaa | ttcactgtgg | 4200 |
| | aaccgctgcc | cgagggtgcc | cagctctctt | ttggcaactt | tgcccaactc | ggccatgagt | 4260 |
| | ccttctactg | gcagctgccc | gagacatacc | aggagagaaa | ggtggcggcc | tacgggtggga | 4320 |
| 30 | agttgcgata | cacctctctc | tacacagcag | gcccacaggg | cagcccactc | tcggaccccc | 4380 |
| | atgtgcagat | cacgggcaac | aacatcatgc | tagtggcctc | ccagccagcg | ctgcagggcc | 4440 |
| | cagagaggag | gagctacgag | atcatgttcc | gagaggaatt | ctggcgccgg | ccgatgggc | 4500 |
| | agccggccac | acgcgagcac | ctcctgatgg | cactggccga | cctggatgag | ctcctgatcc | 4560 |
| | gggccacgtt | ctcctccgtg | cgctgggtgg | ccagcatcag | cgagtcagc | ctggaggtcg | 4620 |
| 35 | cccagccggg | gccctcaaac | agaccgcgc | ccctcgaggt | ggaggagtgc | cgtgcccgc | 4680 |
| | caggctacat | cggtctgtcc | tgccaggact | gtgccccgg | ctacacgcgc | accgggagtg | 4740 |
| | ggctctacct | cggccactgc | gagctatgtg | aatgcaatgg | ccactcagac | ctgtgccacc | 4800 |
| | cagagactgg | ggcctgctcg | caatgccagc | acaacgcgc | aggggagttc | tgcgagcttt | 4860 |
| | gtgccccctg | ctactacgga | gatgccacag | ccgggacgcc | tgaggactgc | cagccctgtg | 4920 |
| 40 | cctgcccact | gaccaaccca | gagaacatgt | tttcccgcac | ctgtgagagc | ctgggagccg | 4980 |
| | gcgggtaccg | ctgcacggcc | tgcgaaccgg | gctacactgg | ccagtactgt | gagcagtggt | 5040 |
| | gcccagggtta | cgtgggtaac | cccagtgtgc | aagggggcca | gtgcctgcca | gagacaaacc | 5100 |
| | aagccccact | ggtggtcgag | gtccatcctg | ctcgaagcat | agtgccccaa | ggtggctccc | 5160 |
| | actccctgcg | gtgtcagggtc | agtgggagcc | cacccccacta | cttctattgg | tcccgtgagg | 5220 |
| 45 | atgggcggcc | tgtgcccagc | ggcaccagc | agcgacatca | aggctccgag | ctccacttcc | 5280 |
| | ccagcgtcca | gccctcggat | gctggggtct | acatttgca | ctgccgtaat | ctccaccaat | 5340 |
| | ccaataccag | cggggcagag | ctgctgggtca | ctgaggtccc | aagcaagccc | atcacagtga | 5400 |
| | ctgtggagga | gcagcggagc | cagagcgtgc | gccccggagc | tgacgtcacc | ttcatctgca | 5460 |
| | cagccaaaaa | caagtcccca | gcctataccc | tggtgtggac | ccgcttgca | aacgggaaac | 5520 |
| 50 | tgcccacccg | agccatggat | ttcaatggca | tctgacctat | tcgcaacgtc | cagctgagtg | 5580 |
| | atgcaggcac | ctacgtgtgc | accggctcca | acatgtttgc | catggaccag | ggcacagcca | 5640 |
| | ctctacatgt | gcaggcctcg | ggcaccttgt | ccgccccgt | ggtctccatc | catccgccac | 5700 |
| | agctcacagt | gcagcccggg | caactggcgg | agttccgctg | cagcgccaca | gggagcccca | 5760 |
| | cgccaccctc | cgagtggaca | ggggggcccc | gcggccagct | ccctgcgaag | gcacaaatcc | 5820 |
| 55 | acggcgccat | ctgcgcctg | ccagctgtcg | agccacgga | tcaggccag | tacttggtcc | 5880 |
| | gagccacag | cagcgtggg | cagcaggtgg | ccagggctgt | gctccacgtg | catggggggc | 5940 |
| | gtgggcccag | agtccaagtg | agcccagaga | ggaccaggt | ccacgcaggc | cggaccgtca | 6000 |
| | ggctgtactg | cagggtgca | ggcgtgccta | gcgccaccat | cacctggagg | aagggaaggg | 6060 |

5 gcagccctccc accacagggcc cgggtcagagc gcacagacat cggcagactg ctcaccccag 6120
 ccacacagac tgcctgacgcc ggcttctacc tctgcgtggc caccagccct gcaggcactg 6180
 cccagggccc gatgcaagt gttgtccttt cagcctcaga tgcagccca cgggggggta 6240
 agattgagtc ctcacgcctt tctgtgacag aaggggcaaac actcgacctc aactgtgtgg 6300
 10 tggcaggggtc agcccatgcc caggtcacct ggtacaggcg agggggtagc ctgcctcccc 6360
 acacccaggt gcacggctcc cgtctgcggc tccccaggt ctcaccagct gattctggag 6420
 aatatgtgtg cegtgtggag aatggatcgg gccccaagg ggcctccatt actgtgtctg 6480
 tgcctccacgg caccattctt ggccccagct acacccaggt gcccggcagc acccgcccca 6540
 tccgcatcga gccctcctcc tcacacgtgg cgggaaggga gacctggat ctgaactgcg 6600
 15 tgggtgcccgg gcaggccccc gccacaggtca cgtggcaca gcggtggggg agcctccctg 6660
 cccggcacca gacccacggc tcgctgctgc ggctgcacca ggtgaccccg gccgactcag 6720
 gcgagtatgt gtgccatgtg gtgggcacct cgggccccct agaggcctca gtccctggta 6780
 ccacgaagc ctctgtcat cctggaccca tcccacctgt caggatcgag tcttcacct 6840
 ccacagtggc cgaggggcag accctggatc tgagctcggt ggtggcaggg caggccacag 6900
 20 cccaggtcac atggtacaag cgtgggggca gccctccctg ccggcaccag gttcgtggct 6960
 cccgctgtat catcttccag gccctcacct cggatgcggg acagtacgtc tgcggggcca 7020
 gcaacggcat ggaggcctcc atcacgttca cagtaactgg gacccagggg gccaaactag 7080
 cctaccctgc cggcagcacc cagcccatcc gcacgagcc ctcctcctcg caagtggcgg 7140
 aagggcagac cctggatctg aactgcgtgg tgcccgggca gtcccatgcc caggtcacgt 7200
 25 ggcacaagcg tgggggcagc ctccctgtcc ggcaccagac ccacggctcc ctgctgagac 7260
 tctaccaagc gtcccccgcc gactcggggc agtacgtgtg ccgagtgttg ggcagctccg 7320
 tgctctaga ggcctctgtc ctggtcacca ttgagcctgc gggctcagtg cctgcaactg 7380
 ggggtacccc cacggctcgg atcgagtcac cgtcttcgca agtggccgag gggcagacc 7440
 tggacctgaa ctgcctcgtt gctggtcagg cccatgcccc ggtcacgtgg cacaagcgcg 7500
 30 ggggcagcct cccggcccgg caccaggtgc atggctcgag gctacgcctg ctccaggtga 7560
 cccagctga ttcaggggag tacgtgtgccc gtgtggtcgg cagctcaggt acccaggaag 7620
 cctcagctct gtccaccatc cagcagcgcc ttagtggtcc cactcccgag ggtgtggcgt 7680
 acccgtccg catcgagtc tcctcagcct ccttggccaa tggacacacc ctggacctca 7740
 actgcctggt tgccagccag gctccccaca ccacacctg gtataagcgt ggaggcagct 7800
 35 taccagcccg gcaccagatc gtgggctccc ggctgcggat ccctcaggtg actccggcag 7860
 actcgggcca gtacgtgtgt cacgtcagta acggtgcagg ctcccgggag acctcgctca 7920
 tcgtcaccat ccagggcagc ggttccctcc acgtgcccag cgtctcccca ccgatcagga 7980
 tccagtcgtc ttccccacg gtggtggaag ggcagacctt ggaactgaac tgcgtggtcg 8040
 ccaggcagcc ccaggctatc atcacatggt acaagcgtgg gggcagcctt cctcccgac 8100
 40 accagaccca tggctcccac ctgcggttgc accaaatgtc tgtggctgac tcgggcgagt 8160
 atgtgtgccg ggccaacaac aacatcgatg ccctggaggc ctccatcgtc atctccgtct 8220
 cccctagcgc cggcagcccc tccgcccctg gcagctccat gcccatcaga attgagtcac 8280
 cctctcaca cgtggccgaa ggggagaccc tggatctgaa ctgcgtggtc cccgggcagg 8340
 cccatgcccc ggtcacttgg cacaagcgtg ggggcagcct cccagtcac caccagacc 8400
 45 gcggtcacg gctcggtg caccatgtgt cccggcgga ctcgggtgaa tacgtgtgcc 8460
 ggggtgatggg cagctctggc cccctggagg cctcagtcct ggtcaccatc gaagcctctg 8520
 gctcaagtgc tgtccacgtc cccgccccag gtggagcccc acccatccgc atcgagccct 8580
 cctcctcccg agtggcagaa gggcagaccc tggatctgaa gtgcgtgggt cccgggcagg 8640
 cccacgcccc ggtcacatgg cacaagcgtg gaggaaacct ccttgcctgg caccaggtcc 8700
 50 acggcccact gctgaggtg aaccaggtgt ccccggtga ctctggcgag tactcgtgcc 8760
 aagtgaccgg aagctcaggc accctggagg tatctgtcct ggtcacaatt gagccctcca 8820
 gccagggacc cattcctgct ccaggactgg ccagcccat ctacatcgag gcctcctctt 8880
 cacacgtgac tgaagggcag actctggatc tgaactgtgt ggtgccccgg caggcccatg 8940
 cccaggtcac gtgtacaag cgcgggggca gcctccccgc ccggcaccag acccatggct 9000
 55 cccagctgcg gctccacctc gtctccccct ccgactcagg cgagtatgtg tgctgtgag 9060
 ccagcggccc aggccttag caagaagcct ccttcacagt caccgtccc cccagtgagg 9120
 ggtcttccca ccgcttagg agcccggtca tctccatcga cccgcccagc agcaccgtgc 9180
 agcaggggcca ggaagtcagc ttcaagtccc tcatccatga cggggcagcc cccatagcc 9240
 tgcagtggaa gaccggaaac caggagctgg aggacaacct ccacatcagt cccaatggct 9300
 60 ccacatcac catcgtgggc acccgcccca gcaaccacgg tacctaccgc tgcgtggcct 9360
 ccaatgccta cgtgtggcc cagagtgtgg tgaacctcag tgtgcacggg cccctacag 9420
 tgtccgtgct ccccgagggc cccgtgtggg tgaagtggg aaaggctgtc accctggagt 9480
 gtgtcagtc cggggagccc cgtcctctg ctgctggac ccggatcagc agcaccctg 9540

ccaagttgga gcagcggaca tatgggctca tggacagcca cgcgggtgctg cagatttcat 9600
 cagctaaacc atcagatgcg ggcacttatg tgtgccttgc tcagaatgca ctaggcacag 9660
 cacagaagca ggtggaggtg atcgtggaca cgggcgcat ggccccagg gcccctcagg 9720
 tccaagctga agaagctgag ctgactgtgg aggtctggaca cagggccacc ttgcgctgct 9780
 5 cagccacagg cagcccccg cccaccatcc actggtccaa gctgcgttcc ccactgccct 9840
 ggcagcaccg gctggaaggt gacacactca tcataccccg ggtagcccag caggactcgg 9900
 gccagtacat ctgcaatgcc actagccctg ctgggcacgc tgaggccacc atcatcctgc 9960
 acgtggagag cccaccatat gccaccacgg tcccagagca cgcttcgggt caggcagggg 10020
 agacggtgca gctccagtgc ctggctcacg ggacaccccc actcaccttc cagtggagcc 10080
 10 gcgtgggcag cagccttccct gggagggcga cggccaggaa cgagctgctg cactttgagc 10140
 gtgcagcccc tgaggactca ggcgctacc gctgcgggt caccaacaag gtgggctcag 10200
 ccgaggcctt tgcccagctg ctgctccaa ggcctcccgg ctctctccct gccacctcca 10260
 tcccagcagg gtcccagccc accgtgcagg tcacgcctca gctagagacc aagagcattg 10320
 gggcagcgt tgagtccac tgtgctgtgc ccagcgacca gggtagccag ctccgttggg 10380
 15 tcaaggaagg gggctcagctg cctccgggtc acagcgtgca ggatgggggt ctccgaatcc 10440
 agaacttggc ccagagctgc caagggacgt atatatgcca ggcccatgga ccttggggga 10500
 agggccaggc cagtgcaccg ctggttatcc aagccctgcc ctcggtgctc atcaacatcc 10560
 ggacctctgt gcagaccgtg gtggttggcc acgccgtgga gttcgaatgc ctggcactgg 10620
 gtgaccccaa gctcagggtg acatggagca aagttggagg gcacctgcgg ccaggcattg 10680
 20 tgacagcgg aggtgtcgctc aggatcgccc acgtagagct ggctgatgag ggacagtatc 10740
 gctgcactgc caccaacgca gctggcacca cacaatccca cgtcctgctg cttgtgcaag 10800
 ccttgcccca gatctcaatg ccccaagaag tccgtgtgct tgctggttct gcagctgtct 10860
 tcccctgcat agcctcaggc taccctactc ctgacatcag ctggagcaag ctggatggca 10920
 gcctgccacc tgacagccgc ctggagaaca acatgctgat gctgccctca gtccgacccc 10980
 25 aggacgcagg tacctacgtc tgcaccgcca ctaaccgcca gggcaaggtc aaagcctttg 11040
 cccacctgca ggtgccagag cgggtggtgc cctacttcac gcagaccccc tactccttcc 11100
 taccgtgccc caccatcaag gatgcctaca ggaagtccga gatcaagatc accttccggc 11160
 ccgactcagc cgatgggatg ctgctgtaca atgggcagaa gcgagtccca gggagcccca 11220
 ccaacctggc caaccggcag cccgacttca tctccttcgg cctcgtgggg ggaaggcccg 11280
 30 agttccgggt cgatgcaggc tcaggcatgg ccaccatccg ccattcccaca ccaactggccc 11340
 tgggccattt ccacaccgtg accctgctgc gcagccctac ccagggtcc ctgattgtgg 11400
 gtgacctggc cccggtcaat gggacctccc agggcaagtt ccagggcctg gatctgaacg 11460
 aggaactcta cctgggtggc tatcctgact atggtgccat ccccaaggcg gggctgagca 11520
 35 gcggcttcat aggtgtgtgc cgggagctgc gcacccagg cgaggagatc gtcttccatg 11580
 acctcaacct cagggcgac ggcattctcc actgccccac ctgtcgggac cggccctgcc 11640
 agaatggcgg tcagtccat gactctgaga gcagcagcta cgtgtgcgtc tgcccagctg 11700
 gcttcaccgg gagccgctgt gagcactcgc agggcctgca ctgccatcca gaggcctgtg 11760
 ggcccagcgc cacctgtgtg aaccggcctg acggctcagg ctacacctgc cgtgccacc 11820
 40 tgggcccgtc ggggttgccg tgtgaggaag gtgtgacagt gaccaccccc tcgtgtcgg 11880
 gtgctggctc ctacctggca ctgcccgcgc tcaccaacac acaccacgag ctacgcttgg 11940
 acgtggagtt caagccactc gcccctgacg gggctcctgt gttcagcggg gggaagagcg 12000
 ggctgtgga ggacttcgtg tccctggcga tgggtggcgg ccacctggag ttccgtatg 12060
 agttggggtc agggctggcc gttctgcgga gcgccgagcc gctggccctg ggccgctggc 12120
 accgtgtgtc tgcagagcgt ctcaacaagg acggcagcct gcgggtgaat ggtggagccc 12180
 45 ctgtgctgcg ctctctgccc ggcaagagcc agggcctcaa cctgcacacc ctgctctacc 12240
 tgggggggtg ggagccttcc gtgccactgt ccccgccac caacatgagc gctcacttcc 12300
 gcggctgtgt gggcgaggtg tcagtgaatg gcaaacggg ggacctcacc tacagtttcc 12360
 taggcagcca gggcatcggg caatgctatg atagctccc atgtgagcgc cagccttggc 12420
 50 aacatggtgc cagtgcatg cccgctggcg agtatgagtt ccagtgctg tgtcgagatg 12480
 gattcaaaag agacctgtgt gagcacgagg agaaccctg ccagctccgt gaacctgtc 12540
 tgcattgggg cacctgccag ggcacccgct gcctctgcct ccctggcttc tctggccac 12600
 gctgccaaca aggtcttggc catggcatag cagagtccga ctggcatctt gaaggcagcg 12660
 ggggcaatga tgcccctggg cagtacggag cctatttcca cgatgatggc ttctctgct 12720
 55 tccctggcca tgtcttctcc aggagcctgc ccgagtgcc cgagaccatc gagctggagg 12780
 ttccgaccag cacagccagt ggcctcctgc tctggcaggg tgtggaggtg ggagaggccg 12840
 gccaaaggca ggacttcac agcctcgggc ttcaagacgg gcacctgtc ttcaggtacc 12900
 agctgggtag tggggaggcc cgcctggtct ctgaggacc catcaatgac ggcgagtgcc 12960
 accgggtgac agcactgcgg gaggcccgca gaggttccat ccaagtcgac ggtgaggagc 13020


```

tggtcagcgg cgggtcccca gggtcccaacg tggcagtcac cggcaaggcc agcgtctaca 13080
tcggcgggagc ccttgacgtg gccacgctga cggggggcag attctctctg ggcacacag 13140
gctgtgtcaa gaacctggtg ctgcactcgg ccggaccgcg cggcccgccc ccacagcccc 13200
tggacctgca gcaccgcgcc caggcggggg ccaacacacg cccctgcccc tcgtaggcac 13260
5 ctgcctgccc cacacggact cccggggccac gccccagccc gacaatgtcg agtatattat 13320
tattaatatt attatgaatt ttgtgaagaa accgaggcga tgccacgctt tgetgctacc 13380
gccccgggct ggactggagg tgggcatgcc accctcacac acacagctgg gcaaagccac 13440
aaggctggcc agcaaggcag gttggatggg agtgggcacc tcagaaagtc accaggactt 13500
ggggtcagga acagtggctg ggtgggcccc gaactgcccc cactgtcccc ctaccaccag 13560
10 atggagcccc cagatagagc tgggtggcct gtttctgcag ccttgggca gttctcactc 13620
ctaggagagc caacctcggc ttgtgggctg gtgccccaca gctacctgag acgggcatcg 13680
caggagtctc tgccaccac tcaggattgg gaattgtctt tagtgccggc tgtggagcaa 13740
aaggcagctc acccctgggc aggcgggtccc catccccacc agctcgtttt tcagcaccac 13800
cacccacctc caccagccc ctggcacctc ctctggcaga cteccctccc taccacgtcc 13860
15 tectggcctg cattcccacc cctcctgcc agcacacagc ctgggggtccc tccctcaggg 13920
gctgtaaggg aaggccacc ccaactctta ccaggagctg ctacaggcag agcccagcac 13980
tgataggggc cggcccaccg ggccccgccc accccaggcc acatccccac ccatctggaa 14040
gtgaaggccc agggactcct ccaacagaca acggacggac ggatgccgct ggtgctcagg 14100
aaggagctagt gccttaggtg ggggaaggca ggactcacga ctgagagaga gaggaggggg 14160
20 atatgaccac cctgccccat ctgcaggagc ctgaagatcc agctcaagtg ccatcctgcc 14220
agtggccccc agactgtggg gttgggacgc ctggcctctg tgcctagaa gggaccctcc 14280
tgtggtcttt gtcttgattt ttcttaataa acggtgctat ccccgcc 14327

```

25 <210> 58
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <400> 58
 Ile Pro Thr Gly Glu Pro Cys Pro Glu Pro Leu Arg Thr Tyr Gly
 1 5 10 15

35 <210> 59
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <400> 59
 Ile Glu Ser Val Leu Ser Ser Ser Gly Lys Arg Leu Gly
 1 5 10

45 <210> 60
 <211> 18
 <212> PRT
 50 <213> Homo sapiens

<400> 60
 Ala Thr Pro Ala Gln Ala His Leu Lys Lys Pro Ser Gln Leu Ser Ser
 1 5 10 15

55 Phe Ser

<210> 61
 <211> 15
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 61
 10 Arg Ile Gln Ala Met Ile Pro Lys Gly Ala Leu Arg Val Ala Val
 1 5 10 15

 15 <210> 62
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 62
 20 Gly Ile Cys Gln Cys Leu Ala Glu Arg Tyr Ser Val Ile Leu Leu
 1 5 10 15

 25 <210> 63
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 30 <400> 63
 Glu Lys Met His Glu Gly Asp Glu Gly Pro Gly His His His Lys Pro
 1 5 10 15

 35 Gly

 40 <210> 64
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 64
 45 Asp Leu Gln Asn Phe Leu Lys Lys Glu Asn Lys Asn Glu
 1 5 10

 50 <210> 65
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 55 <400> 65
 Val Lys Leu Gly His Pro Asp Thr Leu Asn Gln Gly Glu Phe Lys Glu
 1 5 10 15

Leu Val Arg

5
 <210> 66
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10
 <400> 66
 ttywsntggg ayaaytgytt ygarggnaar gayccngcng tnathmgn 46

15
 <210> 67
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

20
 <400> 67
 taywsnytn cnaarwsnga rttgcngrtn ccngayytng arytnccn 48

25
 <210> 68
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30
 <400> 68
 Phe Ser Trp Asp Asn Cys Phe Glu Gly Lys Asp Pro Ala Val Ile Arg
 1 5 10 15

35
 <210> 69
 <211> 585
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

40
 <400> 69
 gaygcncng gncartaygg ngcntaytty caygaygayg gnttyytngc nttyccnggn 60
 caygtnttyw snmgnwsnyt nccngargtn ccngaracna thgarytnga rgtnmgnacn 120
 wsnacngcnw snggnytnyt nytntggcar ggngtngarg tngngargc nggncarggn 180
 aargayttya thwsnytnng nytnccargay ggncayytng tnttymgnta ycarytnngn 240
 45 wsnngngarg cnmgnytngt nwsngargay ccnathaayg ayggngartg gcaymgngtn 300
 acngcnymn gngarggnmg nmgnngnwn mncargtn ayggngarga rytngtnwn 360
 ggnmgwnsnc cnggncnaa ygtngcngtn aaygcnaarg gnwsngnta yathggnggn 420
 gcncngayg tngcnaeyt nacngnggn mgnttywsnw snggnathac nggntgygn 480
 aaraayytng tnytnayws ngcnmgncn ggngcncnc cncncarcc nytngayyt 540
 50 carcaymgng cncargcngg ngcnaayacn mgncntgyc cnwn 585

55
 <210> 70
 <211> 597
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 70

atgaartggg tntgggcnyt nytnytnytn gcngcntggg cngcngcnga rmngngaytgy 60
 mgngtnwsnw snttymngnt naargaraay ttygayaarg cnmgnttyws nggnacntgg 120
 taygcnatgg cnaaraarga yccngarggn ytnttytnc argayaayat hgtngcngar 180
 ttywsngtng aygaracngg ncaratgwsn gcnacngcna arggnmgngt nmngnytnytn 240
 5 aayaaytggg aygtntgygc ngayatggtn ggnacnttya cngayacnga rgayccngcn 300
 aarttyaara tgaartaytg gggngtngcn wsnttytnc araarggnaa ygaygaycay 360
 tggathgtng ayacngayta ygayacntay gcngtncart aywsntgymg nytnytnaay 420
 ytngayggna cntgygcnga ywsntaywsn ttygtnttyw snmgngaycc naayggnytn 480
 ccncngarg cncaraarat hgtnmgnear mgncargarg arytntgyyt ngcnmgncar 540
 10 taymgnytna thgtncayaa yggntaytgy gayggnmgnw sngarmgnaa yytnytn 597

<210> 71

<211> 579

15 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 71

atgcarwsny tnatgcargc nccnytnytn athgcnytn gnytnytny ngcnacnccn 60
 20 gcncargcnc ayytnaaraa rccnwsncar ytnwsnwsnt tywsntggga yaaytgytty 120
 garggnaarg ayccngcngt nathmgwnsn ytnacnytn arcngaycc nathgtngtn 180
 ccnggnaayg tnacnytnws ngtngtnggn wsnacnwsng tnccnytnws nwsnccnytn 240
 aargtngayy tngtnytn gaargargtn gcnggnytn ggathaarat hccntgyacn 300
 gaytayathg gnwsntgyac nttygarcaay ttytgygayg tnytngayat gytnathccn 360
 25 acnggngarc cntgyccnga rccnytnmgn acntayggny tnccntgyca ytgyccntty 420
 aargarggna cntaywsnyt nccnaarwsn garttygcng tnccngayyt ngarytnccn 480
 wsntggytna cnacnggnaa ytaymgnath garwsngtny tnwsnwsnws nggnaarmgn 540
 ytnngntgya thaarathgc ngcnwsnytn aarggnath 579

30

<210> 72

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

35

<400> 72

Tyr Ser Leu Pro Lys Ser Glu Phe Ala Val Pro Asp Leu Glu Leu Pro
 1 5 10 15

40

<210> 73

<211>

<212> PRT

<213> Homo sapiens

45

<400> 73

MQSLMQAPLL IALGLLLATP AQAHKKPSQ
 LSSFSWDNCD EGKDPVIRS LTLEPDMV
 50 PGNVTL SVVG STSVPLSSPL KVDLVLEKEV
 AGLWIKIPCT DYGSCTFEH FCDVLDMLIP
 TGEPCPEPLR TYGLPCHCPF KEGTYSLPKS
 EFVVPDLELP SWLTGNYRI ESVLSSSGKR
 LGCIKIAASLKI

55

<210> 74
<211>
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5

<400> 74

10

GDVCQDCIQM VTDIQTAVRT NSTFVQALVE
HVKEECDRLG PGMADICKNY ISQYSEIAIQ
MMMHMQDQQP KEICALVGFC DEV

15

<210> 75
<211>
<212> PRT
20 <213> Homo sapiens

<400> 75

25

MTCKMSQLER NIETIINTFH QYSVKLGHPD
TLNQGEFKEL VRKDLQNFLK KENKNEKVIE
HIMEDDLDTN ADKQLSFEEF IMLMARLTWA
SHEKMHEGDE GPGHHHKPGL GEGTP

30

35



(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
25 janvier 2001 (25.01.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/05422 A3

(51) Classification internationale des brevets :
G01N 33/68, 33/564, C07K 14/47, A61K 38/17

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR00/02057

(22) Date de dépôt international : 17 juillet 2000 (17.07.2000)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
99/09372 15 juillet 1999 (15.07.1999) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
BIOMERIEUX STELIYS [FR/FR], Chemin de
L'Orme, F-69280 Marcy L'Etoile (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **ROECK-
LIN, Dominique** [FR/FR], 14 Rue de la Paix, F-67500
Niederschaeffolsheim (FR). **KOLBE, Hanno** [FR/FR], 6

Rue des Tulliers, F-67204 Achenheim (FR). **CHARLES,
Marie-Hélène** [FR/FR], 3 Allée de la Lamperte, F-69420
Condrieu (FR). **MALCUS, Carine** [FR/FR], 9 Rue des
Ronziers, F-69530 Brignais (FR). **SANTORO, Lyse**
[FR/FR], 47 Avenue Bergeron, F-69260 Charbonnières les
Bains (FR). **PERRON, Hervé** [FR/FR], 15 Rue de Boyer,
F-69005 Lyon (FR).

(74) Mandataire : **DIDIER, Mireille**, Cabinet Germain et
Maureau, Boîte Postale 6153, F-69466 Lyon Cedex 06
(FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: USE OF A POLYPEPTIDE FOR DETECTING, PREVENTING OR TREATING A PATHOLOGICAL CONDITION
ASSOCIATED WITH A DEGENERATIVE, NEUROLOGICAL OR AUTOIMMUNE DISEASE

(54) Titre : UTILISATION D'UN POLYPEPTIQUE POUR DETECTER, PREVENIR OU TRAITER UN ETAT PATHOLOGIQUE
ASSOCIE A UNE MALADIE DEGENERATIVE, NEUROLOGIQUE AUTOIMMUNE

(57) Abstract: The invention concerns the use of at least one polypeptide comprising a protein fragment to obtain a diagnostic, prognostic, prophylactic or therapeutic composition for detecting, preventing or treating a pathological condition associated with a degenerative and/or neurological and/or autoimmune disease, said protein being selected among the proteins whereof the peptide sequence in native state corresponds to SEQ ID No 1, SEQ ID No 2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4, SEQ ID No 5, SEQ ID No 6, SEQ ID No 7, SEQ ID No 8, SEQ ID No 9, SEQ ID No 10, SEQ ID No 11, SEQ ID No 12, SEQ ID No 13, SEQ ID No 14, SEQ ID No 15, SEQ ID No 16, SEQ ID No 17, SEQ ID No 18, SEQ ID No 19, SEQ ID No 20, SEQ ID No 21, SEQ ID No 22, SEQ ID No 23, SEQ ID No 24, SEQ ID No 25, SEQ ID No 26, SEQ ID No 27, SEQ ID No 28 and SEQ ID No 29, and the peptide sequences having at least 70 % identity, preferably at least 80 % identity and advantageously at least 98 % identity with any one of the peptide sequences SEQ ID No 1 to SEQ ID No 8 and SEQ ID No 10 to SEQ ID No 29, and the peptide sequences or fragments of said sequences belonging to a common family of proteins selected among perlecan, the precursor of the retinol-binding plasmatc protein, of the precursor of the activator of GM2 ganglioside, of calgranulin B and of saposin B.

(57) Abrégé : Utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 à SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.



WO 01/05422 A3



MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT

Publiée :

avec rapport de recherche internationale

(88) Date de publication du rapport de recherche

internationale:

28 février 2002

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 00/02057

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/68 G01N33/564 C07K14/47 A61K38/17

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, WPI Data, PAJ, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| X | US 5 876 954 A (DOBRANSKY TOMAS ET AL) 2 March 1999 (1999-03-02) column 28; claim 17 & EP 0 667 354 A 16 August 1995 (1995-08-16) claim 5 & WO 95 21859 A cited in the application | 1-21, 40, 51-62 |
| X | WO 97 33466 A (BIO MERIEUX ;RIEGER FRANCOIS (FR); PERRON HERVE (FR); BENJELLOUN N) 18 September 1997 (1997-09-18) cited in the application claims | 1-21, 40, 51-62 |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C☒ Patent family members are listed in annex

* Special categories of cited documents

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 January 2001

Date of mailing of the international search report

08 02 2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hoekstra, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/02057

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No |
|------------|---|----------------------|
| X | JP 08 308582 A (KAO CORP) 26 November 1996 (1996-11-26) the whole document --- | 23 |
| A | RIEGER F ET AL: "UN FACTEUR GLIOTOXIQUE ET LA SCLEROSE EN PLAQUES GLIOTOXICITY IN MULTIPLE SCLEROSIS" COMPTES RENDUS DES SEANCES DE L'ACADEMIE DES SCIENCES. SERIE III: SCIENCES DE LA VIE, NL, ELSEVIER, AMSTERDAM, vol. 319, no. 4, 1 April 1996 (1996-04-01), pages 343-350, XP000602023 ISSN: 0764-4469 abstract --- | 1-21, 40, 51-62 |
| A | KISILEVSKY R ET AL: "ARRESTING AMYLOIDOSIS IN VIVO USING SMALL-MOLECULE ANIONIC SULPHONATES OR SULPHATES: IMPLICATIONS FOR ALZHEIMER'S DISEASE" NATURE MEDICINE, US, NATURE PUBLISHING, CO, vol. 1, no. 2, 1 February 1995 (1995-02-01), pages 143-148, XP000611547 ISSN: 1078-8956 the whole document --- | 1-21, 40, 51-62 |
| A | WO 90 07712 A (BISSENDORF PEPTIDE GMBH) 12 July 1990 (1990-07-12) page 2 --- | 1-21, 40, 51-62 |
| A | WO 98 11439 A (BIO MERIEUX ; PERRON HERVE (FR); MALCUS VOCANSON CARINE (FR); MANDR) 19 March 1998 (1998-03-19) the whole document --- | 1-21, 40, 51-62 |
| A | CA 2 214 843 A (HSC RESEARCH AND DEVELOPMENT LIMITED PARTNERSHIP, CA) 30 April 1999 (1999-04-30) the whole document ----- | 1-63 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR 00 02057

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons

- 1 ☐ Claims Nos
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely
- 2 ☐ Claims Nos
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically
- 3 ☐ Claims Nos
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This international Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows

See additional sheet

After review as per PCT Rule 40.2(e), no fee is to be refunded.

- 1 ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims
- 2 ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee
- 3 ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.

22-39 (completely); 1-21, 40-63 (partly)

- 4 ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest

No protest accompanied the payment of additional search fees

The International Searching Authority found several (groups of) inventions in the international application, namely:

1. Claims: 1-21, 40, 51-62 (partly)

Perlecan polypeptides involved in diagnostic, prognostic, prophylactic or therapeutic methods (For example: SEQ ID No. 1, 2, 69).

2. Claims: 1-21, 40, 51-63 (partly)

Polypeptides precursor of the retinol-binding plasmatic protein involved in diagnostic, prognostic, prophylactic or therapeutic methods (For example: SEQ ID No. 4, 5, 6, 7, 30, 70).

3. Claims: 22-39 (completely); 1-21, 40-63 (partly)

Polypeptides precursor of the GM2 ganglioside involved in diagnostic, prognostic, prophylactic or therapeutic methods (For example: SEQ ID No. 8-16, 66-68, 72).

4. Claims: 1-21, 40-44, 46-63 (partly)

Polypeptides calgranulin B involved in diagnostic, prognostic, prophylactic or therapeutic methods (For example: SEQ ID No. 17-23, 43-52).

5. Claims: 1-21, 40-63 (partly)

Polypeptides saposin B involved in diagnostic, prognostic, prophylactic or therapeutic methods (For example: SEQ ID No. 24-29, 53-55).

6. Claim: 64

Use of lycorin.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FR 00/02057

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| US 5876954 | A | 02-03-1999 | FR 2716198 A | 18-08-1995 |
| | | | AU 701972 B | 11-02-1999 |
| | | | AU 1815295 A | 29-08-1995 |
| | | | CA 2142557 A | 16-08-1995 |
| | | | EP 0667354 A | 16-08-1995 |
| | | | FI 954876 A | 13-10-1995 |
| | | | WO 9521859 A | 17-08-1995 |
| | | | JP 2803910 B | 24-09-1998 |
| | | | JP 8511808 T | 10-12-1996 |
| | | | NO 954081 A | 13-12-1995 |
| | | | NZ 281260 A | 27-05-1998 |
| | | | US 5728540 A | 17-03-1998 |
| WO 9733466 | A | 18-09-1997 | FR 2745974 A | 19-09-1997 |
| | | | AU 2165897 A | 01-10-1997 |
| | | | CA 2221028 A | 18-09-1997 |
| | | | EP 0825811 A | 04-03-1998 |
| | | | JP 11512623 T | 02-11-1999 |
| JP 08308582 | A | 26-11-1996 | NONE | |
| WO 9007712 | A | 12-07-1990 | NONE | |
| WO 9811439 | A | 19-03-1998 | EP 0925504 A | 30-06-1999 |
| CA 2214843 | A | | NONE | |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N°
PCT / FR 00 / 02057

| | | |
|--|--|---|
| A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE IPC 7 G01N 33/68 G01N 33/564 C07K 14/47 A61K 38/17 | | |
| Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la (CIB) | | |
| B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE | | |
| Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) IPC 7 G01N C07K | | |
| Documentation consultée au que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche | | |
| Base de données électroniques consultées au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) BIOSIS, WPI Data, PAJ, EPO-Internal | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS | | |
| Catégorie ^o | Identification des documents cités avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | n°. des revendications visées |
| X | US 5 876 954 A (DOBRANSKY TOMAS ET AL) 2 mars 1999 (02.03.99) colonne 28; revendication 17 & EP 0 667 354 A 16 août 1995 (16.08.95) revendication 5 & WO 95 21859 A cité dans la demande | 1-21, 40, 51-62 |
| X | WO 97 33466 A (BIO MERIEUX; RIEGER FRANCOIS (FR); PERRON HERVE (FR); BENJELLOUN N) 18 septembre 1997 (18.09.97) cite dans la demande revendications | 1-21, 40, 51-62 |
| <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents cités <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div> | | |
| <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>^o Catégorie spéciale de documents cités :</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, n'étant pas considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour permettre de comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"&" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div> | | |
| Date à laquelle la recherche a été effectivement achevée 30 janvier 2001 (30.01.01) | | Date d'expédition du rapport de recherche 08 février 2001 (08.02.01) |
| Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen Brevets n° de télécopieur | | Fonctionnaire autorisé n° de téléphone |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT / FR 00 / 02057

| C. (suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | |
|--|--|------------------------------|
| Categorie ^c | Documents cites avec, le cas echeant, l'indication des passages pertinents | n° des revendications visees |
| X | JP 08 308582 A (KAO CORP) 26 novembre 1996 (26.11.96) le document en entier | 23 |
| A | RIEGER F ET AL : "UN FACTEUR GLIOTOXIQUE ET LA SCLEROSE EN PLAQUES GLIOTOXICITY IN MULTIPLE SCLEROSIS" COMPTES RENDUS DES SEANCES DE L'ACADEMIE DES SCIENCES. SERIE III: SCIENCE DE LA VIE, NL, ELSEVIER, AMSTERDAM, Vol. 319, no. 4, 1 avril 1996 (01.04.96), pages 343-350, XP000602023 ISSN: 0764-4469 Abrégé | 1-21, 40, 51-62 |
| A | KISILEVSKY R ET AL: "ARRESTING AMYLOIDOSIS IN VIVO USING SMALL-MOLECULE ANIONIC SULPHONATES OR SULPHATES: IMPLICATIONS FOR ALZHEIMER'S DISEASE" NATURE MEDICINE, US, NATURE PUBLISHING, CO, Vol. 1, no. 4, 1 février 1995 (01.02.95), pages 143-148, XP0611547 ISSN: 1078-8956 Le document en entier | 1-21, 40, 51-62 |
| A | WO 90 07712 A (BISSENDORE PEPTIDE GMBH) 12 juillet 1990 (12.07.90) page 2 | 1-21, 40, 51-62 |
| A | WO 98 11439 A (BIO MERIEUX : PERRON HERVE (FR); MALCUS VOCANSON CARINE (FR); MANDOR) 19 mars 1998 (19.03.98) Le document en entier | 1-21, 40, 51-62 |
| A | CA 2 214 843 A (HSC RESEARCH AND DEVELOPMENT LIMITED PARTNERSHIP, CA) 30 avril 1999 (30.04.99) Le document en entier | 1-63 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR 00/02057

Cadre I Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2(a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n^{os} se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☐ Les revendications n^{os} se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n^{os} sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

voir feuille supplémentaire

Après réexamen selon la Règle 40.2(e) PCT,
aucune taxe additionnelle n'est à rembourser.

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☒ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n^{os} 22-39 complet, 1-21 and 40-63 en partie
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n^{os}

Remarque quant à la réserve

- ☒ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/SA/ 210

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs (groupes d') inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. revendications: 1-21, 40, 51-62 en partie

Polypeptides perlecans être impliquées dans les méthodes diagnostiques, pronostique, prophylactiques ou thérapeutiques (Par exemple: SEQ ID No 1, 2, 69).

2. revendications: 1-21, 40, 51-63 en partie

Polypeptides précurseur de la protéine plasmatique de liaison de rétinol être impliquées dans les méthodes diagnostiques, pronostique, prophylactiques ou thérapeutiques (Par exemple: SEQ ID No 4, 5, 6, 7, 30, 70).

3. revendications: 22-39 complet; 1-21, 40-63 en partie

Polypeptides précurseur de l'activateur du ganglioside GM2 être impliquées dans les méthodes diagnostiques, pronostique, prophylactiques ou thérapeutiques (Par exemple: SEQ ID No. 8-16, 66-68, 72).

4. revendications: 1-21, 40-44, 46-63 en partie

Polypeptides calgranuline B être impliquées dans les méthodes diagnostiques, pronostique, prophylactiques ou thérapeutiques (Par exemple: SEQ ID No. 17-23, 43-52).

5. revendications: 1-21, 40-63 en partie

Polypeptides saposine B être impliquées dans les méthodes diagnostiques, pronostique, prophylactiques ou thérapeutiques (Par exemple: SEQ ID No. 24-29, 53-55).

6. revendication : 64

Utilisation de la lycorine

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 00/02057

| Document brevet cité au rapport de recherche | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | Date de publication |
|---|------------------------|--|--|
| US 5876954 A | 02-03-1999 | FR 2716198 A AU 701972 B AU 1815295 A CA 2142557 A EP 0667354 A FI 954876 A WO 9521859 A JP 2803910 B JP 8511808 T NO 954081 A NZ 281260 A US 5728540 A | 18-08-1995 11-02-1999 29-08-1995 16-08-1995 16-08-1995 13-10-1995 17-08-1995 24-09-1998 10-12-1996 13-12-1995 27-05-1998 17-03-1998 |
| WO 9733466 A | 18-09-1997 | FR 2745974 A AU 2165897 A CA 2221028 A EP 0825811 A JP 11512623 T | 19-09-1997 01-10-1997 18-09-1997 04-03-1998 02-11-1999 |
| JP 08308582 A | 26-11-1996 | NONE | |
| WO 9007712 A | 12-07-1990 | NONE | |
| WO 9811439 A | 19-03-1998 | EP 0925504 A | 30-06-1999 |
| CA 2214843 A | | NONE | |